

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 2 月 1 日 (01.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/07475 A1

(51) 国際特許分類: C07K 14/47, C12N 15/12,  
1/21, C12P 21/02, C07K 16/18, A61K 38/18, A61P 5/06,  
19/08, A61K 45/00, 48/00, G01N 33/53

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04907

(22) 国際出願日: 2000 年 7 月 24 日 (24.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平 11/210002 1999 年 7 月 23 日 (23.07.1999) JP  
特願平 11/338841  
1999 年 11 月 29 日 (29.11.1999) JP  
特願 2000/126623 2000 年 4 月 26 日 (26.04.2000) JP

(71) 出願人 および  
(72) 発明者: 寒川賢治 (KANGAWA, Kenji) [JP/JP]; 〒562-0031 大阪府箕面市小野原東 6 丁目 28、4-201 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 児島将康 (KOJIMA, Masayasu) [JP/JP]; 〒560-0005 大阪府豊中市西緑丘 1 丁目 5-1、302 号 Osaka (JP). 細田洋司 (HOSODA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒562-0034 大阪府箕面市西宿 2 丁目 12-12 藤和箕面ホームズ A808 号 Osaka (JP). 松尾壽之

(MATSUO, Hisayuki) [JP/JP]; 〒658-0073 兵庫県神戸市東灘区西岡本 6 丁目 4-24, 204 号 Hyogo (JP). 南竹義春 (MINAMITAKE, Yoshiharu) [JP/JP]; 〒370-0503 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ 2716 番地 1 サントリー株式会社 医薬センター内 Gunma (JP).

(74) 代理人: 弁理士 岩谷 龍 (IWATANI, Ryo); 〒530-0003 大阪府大阪市北区堂島 2 丁目 1 番 27 号 桜橋千代田ビル 5 階 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PEPTIDES

(54) 発明の名称: 新規ペプチド

(57) Abstract: Novel peptides compounds inducing the secretion of growth hormone. Peptide compounds or pharmaceutically acceptable salts thereof having an activity of elevating calcium ion concentration in cells which are characterized in that at least one amino acid has been substituted by a modified amino acid and/or a non-amino acid compound.

(57) 要約:

成長ホルモンの分泌を誘導する新規ペプチド系化合物を提供する。

細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。



WO 01/07475 A1

## 明 細 書

## 新規ペプチド

## 5 技術分野

本発明は、ペプチド中のアミノ酸が修飾されていることを特徴とした、細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有する新規ペプチドに関する。本願発明はまた、当該新規ペプチドの取得方法及び製造方法、該ペプチド及び該ペプチドの前駆体をコードする遺伝子、及び当該遺伝子を用いた該ペプチド及び該ペプチドの前駆体の製造方法に関する。さらに本願発明は、本願発明により開示された新規修飾ペプチドの構造類似体で、成長ホルモン分泌誘導化合物のレセプターに結合して細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有するペプチド類縁体及びその製造方法に関する。本願発明はまた、該ペプチド若しくは該ペプチド類縁体を有効成分とする医薬用組成物、動物用成長促進剤、又は該ペプチドの抗体若しくはその利用方法に関する。

## 背景技術

20 成長ホルモン（growth hormone、以下単に GH と略称する）は、下垂体前葉で合成されるタンパク質ホルモンで、骨の成長及び脂肪細胞や軟骨細胞の分化を間接的に促進し、その分泌は、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH; growth hormone-releasing hormone）で促進され、ソマトスタチン（somatostatin）で阻害される [J. Kendrew, et al., Eds., The  
25 Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 462 ] 。 GH は単に成長を促すだけではなく、各種組織でのタ

ンパク質合成の促進、貯蔵脂肪の移動の刺激及び筋肉中のグリコーゲン含量の上昇などの作用もあり、GH分泌の低下は小人症を、過剰分泌は巨人症又は末端肥大症を惹起する〔八杉龍一ら編，岩波生物学辞典第4版（岩波書店，東京，1997），757頁〕。

- 5 ヒト GH が遺伝子組換え技術によって生産されるようになって以来、GH は上記小人症の治療〔J. O. Jorgensen, *Endocr. Rev.* 12, 189 (1991)] だけでなく、他の疾患の治療にも用いられ、様々な効果が見いだされた〔J. O. Jorgensen, et al., *Horm. Res.* 42, 235 (1994)]。例えば、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化〔K. Brixen, et al., *Miner. Res.* 5, 609 (1990)]、GH 欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強〔R. C. Cuneo, et al., *J. Appl. Physiol.* 70, 688 (1991)]、GH 欠乏症成人での運動能力の向上〔R. C. Cuneo, et al., *J. Appl. Physiol.* 70, 695 (1991)]、小児の重度火傷治癒〔D. N. Herndon, et al., *Ann. Surg.* 212, 424 (1990)]、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用〔R. Homburg, et al., *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 32, 781 (1990)]、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防〔F. F. Horber and M. W. Haymond, *J. Clin. Invest.* 86, 265 (1990)]、重度免疫不全症における T 細胞「教育」の促進〔W. J. Murphy, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4481 (1992)]、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果〔D. Rudman, et al., *N. Engl. J. Med.* 323, 1 (1990)] など
- 10  
15  
20
- がある。

- 小児の成長促進、及び成人の GH 欠乏に伴う代謝や機能の欠損の正常化に、組換え GH の投与は効果的ではあるが、用量限定的な副作用があること、経口投与ができないこと及びコスト面で問題がある〔B. A. Lefker, et al., in *Growth Hormon Secretagogues in Clinical Practice*, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998),
- 25

- p. 107-p. 108 ]。多くの成人患者は、過剰なナトリウムと体液の貯留によると思われる関節痛や手根管症候群のような副作用のため、GH 投与を継続することができない [E. Corpas, et al., *Endocr. Rev.* 14, 20 (1993)]。これらの副作用は、GH 投与によるホルモン分泌の非生理的な
- 5 パターンと関係しており、GH の投与では正常な GH 分泌の拍動性 (pulsatility) をまねることができない [B. A. Lefker, et al., in *Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice*, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p. 107-p. 108]。
- 10 生体内での GH 分泌の拍動性は、基本的には視床下部由来の 2 つの制御因子の相互作用によって確立される、すなわち GHRH とソマトスタチンが下垂体に作用して GH 分泌を制御している [G. S. Tannenbaum and N. Ling, *Endocrinology* 115, 1952 (1984), R. G. Clark and I. C. Robinson, *Endocrinology* 122, 2675 (1988)]。正常な GH 分泌のパターンは昼夜で
- 15 異なり、夜間に、より多くの GH がより頻繁に放出される。GH の放出パルスの振幅は、種々のステロイド・ホルモン、神経伝達物質、GH とインシュリン様成長因子によるフィードバック、栄養状態、睡眠及び運動によって、さらに調節される [J. S. Strobeil and M. J. Thomas, *Pharmacol. Rev.* 46, 1 (1994)]。
- 20 上に記載した GH 投与に伴う副作用を克服するために、GH 分泌誘導活性を有する化合物が数多く合成され、GH 分泌誘導物質 (GHS; growth hormone secretagogue) としてその構造活性相関、薬理学、臨床応用が精力的に研究された。まず、GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) などのペプチドが合成され、GH の欠損乃至は低下に起因
- 25 する治療薬として開発された [C. Y. Bowers, et al., *Endocrinology* 114, 1537-1545 (1984)]。しかし、これらのペプチド化合物は静脈注射でし

か効果を発揮できないので、経口投与可能な低分子量の非ペプチド系化合物が開発され[R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)]、第二相臨床試験の段階にまで進んでいるものもある [A. A. Patchett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 7001-7005 (1995)]。

- 5 細胞における、レセプターのシグナル受容から機能発現に至るまでの一連の情報伝達をシグナル伝達 (signal transduction) というが、G タンパク質と共役したシグナル伝達系は以下のような機構で進行する [ 八杉龍一ら編, 岩波生物学辞典第 4 版 (岩波書店, 東京, 1997), 555-556 頁]。この G タンパク質共役系は細胞膜 7 回貫通型レセプターを
- 10 もち、cAMP をセカンドメッセンジャーとして産生する cAMP 系とイノシトール-1, 4, 5-三リン酸 (IP3) やジアシルグリセロール (DG) イノシトールリン脂質情報伝達系に分けられる。cAMP は cAMP 依存性のキナーゼ (A キナーゼ) を活性化し、機能タンパク質のセリンやトレオニン残基のリン酸化を起し、活性を修飾する。一方、IP3 は小胞体上の IP3 受
- 15 容体と結合し、カルシウムイオンの遊離を促し、DG は C キナーゼを活性化してホルモンなどの作用発現を促す。

- IP3 や DG をセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系で、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する機構は以下の如くである [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell
- 20 Science Ltd., London, 1994), p. 136-137]。レセプターヘリガンドが結合すると、G タンパク質を介してホスホリパーゼ C が活性化されて、PIP2 から IP3 が生成する。IP3 は細胞内顆粒である ER などの小胞体に貯蔵されているカルシウムイオンを細胞質に放出させ、細胞質中のカルシウムイオン濃度が上昇する。IP3 もしくはカルシウムイオンがさらに細胞
- 25 質に存在すると、カルシウムは再び小胞体に取り込まれ、細胞質中のカルシウムイオン濃度は低下する。すなわち、レセプターへのリガンド

の結合は、細胞質中のカルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらす。

GHS は GHRH による GH の分泌及び細胞内 cAMP レベルの上昇に協奏的に作用すること [K. Cheng, et al., *Endocrinology* 124, 2791-2798 (1989)], 及び GHRH のレセプターへの結合は cAMP をセカンドメッセンジャーとして産生するのに対して、GHS は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇をもたらすことから、GHS の作用機作は GHRH のそれとは異なることが示唆され [J. Herrington and B. Hille, *Endocrinology* 135, 1100-1108 (1994).]、GHS は GHRH が結合する GHRH レセプターとは異なるレセプターに結合することが想定された。実際に GHS が結合するレセプター遺伝子がクローニングされ、ノザン解析の結果から GHS レセプター (GHS-R) は視床下部及び脳下垂体で発現していること、及びブタとヒト由来の GHS-R のアミノ酸配列が 90%以上の同一性を示すことがわかった [A. D. Howard, et al., *Science* 273, 974-977 (1996)]。しかし、GHS-R に結合する内在性のリガンドは単離されておらず、この GHS-R は

5  
10  
15

タンパク質のアミノ末端又はタンパク質を構成するアミノ酸残基の側鎖に、ミリスチン酸、ゲラニル酸、パルミトイル酸、又はファルネシル酸などの脂肪酸が結合することがあるが、これらの脂肪酸の役割はこれらの脂肪酸修飾タンパク質を細胞膜にアンカーリング (anchoring) することにある [J. Kendrew, et al., Eds., *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 616]。これらの脂肪酸修飾タンパク質において、脂肪酸はシステイン残基に S-アシル結合で結合しており、本願発明によって開示された内在性の GHS のようにセリン残基に O-アシル結合で脂肪酸が結合したアミノ酸、この脂肪酸修飾アミノ酸を含むタンパク質及びペプチドは全く知られていなかった。

20  
25

また、脂肪酸で修飾されたアミノ酸を含むペプチドが、いかなるレセプ

ターのリガンドとして機能することも知られていなかった。

#### 発明の開示

本発明を詳細に説明するに先立ち、用語を以下のように定義する。

- 5      ペプチドとは、複数のアミノ酸がペプチド結合で連なった化合物のことをいう。ここでアミノ酸(又はアミノ酸残基とも表現する)とは、アミノ酸の一般式； $\text{NH}_2\text{-CH(R')-COOH}$  において、 $\text{R}'$  が天然に存在する置換基を有する天然アミノ酸の他、その D, L-光学異性体等を含む。

- 天然アミノ酸が修飾アミノ酸(又は修飾アミノ酸残基と表現する)で置換されている場合もある。修飾アミノ酸は、上記一般式の置換基  $\text{R}'$  がさらに修飾されたアミノ酸及びその D, L-光学異性体ばかりではなく、例えば上記一般式の置換基  $\text{R}'$  において、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド、カルバミド又はチオカルバミド等を介して又は介さずに、様々な置換基が結合した非天然アミノ酸も含む。また、アミノ酸のアミノ基に低級アルキル基が置換されている非天然アミノ酸も含まれる。
- 10
- 15

- ペプチド類縁体とは、ペプチドにおいて少なくとも1つのアミノ酸が非アミノ酸化合物で置換された化合物のことをいい、従って当該置換化合物のペプチド類縁体への少なくとも1つの結合はペプチド結合ではない。
- 20

また、これらペプチド及びペプチド類縁体のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端が修飾された化合物を誘導体とし、ペプチド、ペプチド類縁体及びそれらの誘導体を総称してペプチド系化合物とした。

- 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列とは、以下に掲げる配列をいう。
- 25

Gly Ser Ser Phe、

- Gly Ser Ser Phe Leu、  
Gly Ser Ser Phe Leu Ser、  
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro、  
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu、  
5 Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His、又は、  
Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln。

GHS レセプターに結合して細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又は GH 分泌を誘導する活性を有する内在性のリガンド、すなわち内在性 GHS の発見及び利用方法が所望されていた。さらに、当該内在性 GHS の構造類似体で、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又は GH 分泌誘導活性を有する化合物が望まれていた。また、当該内在性 GHS 又はその構造類似化合物を含有し、GH の拍動的な分泌を誘導することによって GH 投与による副作用のない医薬組成物あるいは動物の成長を促進  
10 するための組成物、及び当該組成物を用いた治療方法が所望されていた。

本願発明者らは、GHS レセプター (GHS-R) へのリガンドの結合がイノシトールリン脂質をセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらすことに着目し、GHS-R を発現させた CHO 細胞 (CHO-GHSR62) において細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性 (Ca 上昇活性) を指標に、各種臓器又は組織の抽出物をスクリーニングした。その結果、ラット胃の抽出物に強い Ca 上昇活性があることを見いだし、当該抽出物より各種クロマトグラフィーを用いて Ca 上昇活性を有する物質を精製して、該物質が脂肪酸で修飾された分子量約 3,000 の新規ペプチドであることを見いだした。さらに当該新規ペプチドが、下垂体前葉細胞からの GH の特異的な分泌を促進することを確認し  
20  
25 ドが、下垂体前葉細胞からの GH の特異的な分泌を促進することを確認して、該新規ペプチドが GHS-R の内在性のリガンド、すなわち内在性 GH



分泌誘導物質（内在性 GHS）であることを見出した。すなわち、本願発明の第一は、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性又は GH 分泌誘導活性を有し、構成アミノ酸残基が脂肪酸で修飾されていることを特徴とする内在性の GH 分泌誘導ペプチド、及び該ペプチドの取得方法である。

本願発明者らは、該内在性 GH 分泌誘導ペプチドの構造を詳細に解析し、該ペプチドが配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであり、アミノ末端から 3 番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることを見出した。またラットと同様、強い Ca 上昇活性が存在するヒト胃抽出物中からも、ラット由来の GH 分泌誘導ペプチドと同様の方法で精製及び構造解析を行った結果、ヒト由来の内在性 GH 分泌誘導ペプチドも配列番号 3 に記載のアミノ酸配列からなり、アミノ末端から 3 番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることがわかった。ラット及びヒト由来の内在性 GH 分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列を比較すると全体で 89% の高い同一性を示した。

より詳しくは、ラットとヒトではアミノ末端から 10 番目までのアミノ酸配列及び 13～28 番目のアミノ酸配列は同一であるが、11 番目と 12 番目のアミノ酸がラットでリジン、アラニンであり、ヒトでこれらがそれぞれアルギニン、バリンに置換されている点で相違している。ラット由来の内在性 GH 分泌誘導ペプチドを各種プロテアーゼで切断し、精製したペプチド断片の Ca 上昇活性を測定した結果、アミノ末端から 7 番目までのアミノ酸配列からなるペプチドが Ca 上昇活性を有する最小のペプチドであった。

さらに、化学合成したペプチドの Ca 上昇活性の測定などから、Ca 上昇活性発現に必須のコア配列は配列番号 8 に記載の 4 アミノ酸からなる配列であることがわかった。また、ラット以外のヒト、ブタ、ウシから分

離した内在性 GH 分泌誘導ペプチド (28 アミノ酸) およびこれらのペプチドから 1 つグルタミンが欠失した内在性 GH 分泌誘導ペプチド (27 アミノ酸) のいずれにおいても、配列番号 9 に記載の 10 アミノ酸からなる配列が保存されていた。

- 5      すなわち、本願発明の第 2 は、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号 1 に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を Ca 上昇活性発現に必須のコア配列として含む脂肪酸修飾ペプチドである。

- 10      なお、ニワトリ、ウナギ、カエルからも内在性 GH 分泌誘導ペプチドが単離され、配列番号 8 に記載の 4 アミノ酸からなるコア配列を有していることがわかった。

一方、カエルからもラットの内在性 GH 分泌誘導ペプチドと非常に類似性の高い内在性 GH 分泌誘導ペプチドが単離された。

- 15      さらに、アフリカツメガエル、ニジマス、イヌからも内在性 GH 分泌誘導ペプチドが単離された。なお、ニジマスからは、23 アミノ酸からなるグレリン-23 と、20 アミノ酸からなるグレリン-20 とが単離された。

なお、ウナギのグレリン、ニジマスのグレリン-23 およびグレリン-20 のカルボキシル基末端のアミノ酸はアミド化されていた。

- 20      また、アフリカツメガエルの内在性 GH 分泌誘導ペプチドはアミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基がトレオニンであったことから、本発明は、配列番号 8 に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号 1 に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号 9 に記載のアミノ酸配列のアミノ末端から 3 番目のアミノ酸残基セリンをトレオニンに変換したペプチドを  
25      Ca 上昇活性発現に必須のコア配列として含む脂肪酸修飾ペプチドにも関する。

本願発明によって開示された GH 分泌誘導活性をもつ内在性脂肪酸修飾ペプチド又は上記コア配列からなる脂肪酸修飾ペプチドは、Ca 上昇活性を有する化合物の設計指針も提供する。

- すなわち、本発明の第三は、当該脂肪酸修飾ペプチドの構造類似化合物を合成し、該構造類似化合物の Ca 上昇活性を確認することにより、Ca 上昇活性を有する新規化合物を取得することである。従って、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド又はペプチド類縁体において、構成アミノ酸が修飾アミノ酸又は非アミノ酸化合物で置換された化合物も本願発明に属することはいうまでもない。
- 10 内在性 GH 分泌誘導ペプチドをコードする cDNA を常法により取得した。配列番号 4 及び 5 に記載したアミノ酸配列に示された如く、ラット及びヒトの cDNA はいずれも 117 アミノ酸からなり、アミノ末端から 24 番目ないし 51 番目まで 28 アミノ酸の配列がラット及びヒトの内在性 GH 分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列と各々一致した。すなわち、内在性 GH 分泌
- 15 誘導ペプチドは 117 アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成され、アミノ末端側の 23 アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、さらにカルボキシル末端側の 56 アミノ酸が切断除去されて GH 分泌誘導活性をもつ脂肪酸修飾ペプチドが生成することが明らかになった。また、ブタからも 28 アミノ酸からなる内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体を
- 20 コードする cDNA が見いだされた。

さらに、ブタからも 27 アミノ酸からなる内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体をコードする cDNA が見いだされた。

また、ウシからも 27 アミノ酸からなる内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体をコードする cDNA が部分的であるが見いだされた。

- 25 またさらに、ウナギ、アフリカツメガエル、ニジマスからも内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体をコードする cDNA が見いだされた。なお、二

ジマスからは、23 アミノ酸からなるグレリン-23 の前駆体をコードする cDNA と、20 アミノ酸からなるグレリン-20 の前駆体をコードする cDNA とが単離された。

従って、本願発明の第 4 は、内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体をコードする cDNA 及び当該 cDNA を用いた Ca 上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又はペプチド類縁体の原料となるペプチドの製造方法である。

ラット胃抽出物から 28 アミノ酸で構成される内在性 GH 分泌誘導ペプチド（グレリン）を精製する際に、マイナー画分として回収されるペプチドを解析したところ、グレリンの 13 番目若しくは 14 番目のグルタミンが 1 つ欠失した 27 アミノ酸からなるペプチド（グレリン-27）を見

10 いだした。グレリン-27 は 28 アミノ酸からなるグレリンと全く同様の Ca 上昇活性および GH 分泌誘導活性を有しており、内在性の GH 分泌誘導ペプチドであるから、該グレリン-27 も本発明に属する。

グレリンの 13 番目および 14 番目のグルタミンをコードしている塩基配列は、gca gca であり mRNA のスプライシング (splicing) が起こるエクソンの末端の配列であり、異ったスプライシングが起こることにより、2 つのグルタミンのコドンのうち 1 つが脱落した cDNA が生成する可能性が示唆された。実際にラット及びヒトの cDNA ライブラリーを探索したところ、27 アミノ酸からなるグレリン-27 の前駆体ペプチドをコードする cDNA が見つかった。

すなわち、ラットおよびヒトのグレリン-27 ペプチドは、配列番号 1 2  
又は 1 3 に記載した 116 アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成さ  
れ、アミノ末端側の 23 アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、  
さらにカルボキシル末端側の 56 アミノ酸が切断除去されて 27 アミノ酸  
からなる GH 分泌誘導活性をもつ脂肪酸修飾ペプチドとして生成すること  
が明らかになった。

また、ブタおよびウシからもグレリン-27 ペプチドの前駆体をコードする cDNA が見いだされ、これらの動物においてもグレリン-27 およびその前駆体の存在が確認された。

すなわち、配列番号 10, 11, 17 および 22 記載のアミノ酸配列  
5 からなるグレリン-27 ペプチド、及び配列番号 12, 13, 19 および 23 記載のアミノ酸配列を有するグレリン-27 前駆体ペプチド、並びに配列番号 14, 15, 21, および 24 に記載の塩基配列を有する該前駆体ペプチドをコードする cDNA も本発明に属することはいうまでもない。

本願発明で開示された Ca 上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又は  
10 Ca 上昇活性を有するペプチド類縁体等のペプチド系化合物は、GH の欠損又は低下に起因する疾患を治療するための医薬組成物も提供する。該医薬組成物は GH の投与が有効である全ての疾患に用いることができ、GH の投与によって生じる様々な副作用を克服することができる。また、該医薬組成物は動物の成長促進剤などの動物用薬剤としても用いることが  
15 できる。

本発明に係るペプチド系化合物は脳室内投与および静脈内投与によって食欲増進作用があることから、食欲不振や拒食症を治療するための食欲増進剤として用いることができる。また、運動および胃酸分泌を促進する作用があることから、非潰瘍性消化不良、突発性軽症胃アトニー、  
20 機能性消化不良および逆流性食道炎等の胃機能性疾患の治療剤として用いることもできる。さらに、静脈内投与により骨髓、十二指腸および空腸において細胞増殖促進作用が認められたことから、腸管粘膜保護剤、経静脈栄養時の小腸粘膜障害予防剤及び骨粗鬆症治療剤として用いることもできる。

25 本願発明で開示された Ca 上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原として調製された抗体、当該抗体を用いた内在性 GH 分泌誘導ペプチド

の測定方法、及び該抗体を具備した測定キットも本願発明に属する。

また、グレリンのアミノ末端側及びカルボキシル末端側のペプチドに対する抗体を作成し、前者が3位セリンを修飾している脂肪酸を特異的に認識することを利用して、脂肪酸で修飾されたグレリンと脂肪酸が脱  
5 離したグレリンとを分別定量することができるアッセイ方法、およびグレリンのアミノ末端側ペプチドに対する抗体とカルボキシル末端側のペプチドに対する抗体とを組み合わせた検査キットも本願発明に属する。

すなわち本願発明は、アシル化セリンという新規修飾アミノ酸を有する新規ペプチドホルモンを提供し、又当該ペプチドの構造を基本骨格と  
10 するCa上昇活性有する化合物の新規設計指針をも提供する。

さらに、本願発明によって開示された脂肪酸修飾ペプチド、GH放出ホルモン及びソマトスタチンによるGH分泌誘導機構の解明は、単にGH分泌誘導機構に限らず他のホルモン分泌制御機構にも敷衍することが示唆される。本願発明は、脂肪酸修飾ペプチドの循環器系および代謝系の制  
15 御因子としての多様な機能を開示するものであり、本願発明の効果は新しい生体制御機構の解明にも及ぶものである。

具体的には本発明は

(1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドの少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ  
20 酸化合物により置換されていることを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(2) (a) 配列番号2記載のアミノ酸配列又は(b)当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつ該アミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミ  
25 ノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(3) 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (2) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 5 (4) 配列番号 25、26、29、30、31、32、34 および 35 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (2) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 10 (5) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドの (a) 構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ (b) 少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

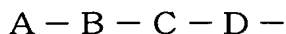
- 15 (6) 配列番号 27、28 および 33 記載のアミノ酸配列を有する前記 (1) 又は (5) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 20 (7) (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記 (5) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 25 (8) 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (7) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(9) 配列番号 25、26、29、30、31、32、34 および 35 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (7) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 5 (10) アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が、下記の式で表される前記 (1) 又は (5) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、



A ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

- 10 B ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

(ただし、A + B の分子鎖長がジペプチド相当長ある、)

C 又は D ; 同一であっても異なってもよく、(a) 修飾されたアミノ酸、又は (b) 疎水性側鎖を有するアミノ酸、を表す、

- 15 (11) C が、アミノ酸の  $\alpha$  炭素に、(a) 炭素数 1 以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエーテル、アミドまたはジスルフィド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は (b) 炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸であり、D が疎水性側鎖を有するアミノ酸  
20 であることを特徴とする前記 (10) に記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- (12) 配列番号 2、3、9、10、11、16、17、22、25、26、27、28、29、30 および 31 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列において、アミノ末端の 1 番目  
25 から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が前記 (10) または (11) に記載のペプチド系化合物であるペプチド系化合物又はそ



の薬学的に許容される塩、

(13) 修飾されたアミノ酸がアミノ末端から3番目のアミノ酸である前記(1)、(2)、(3)、(5)、(7)または(8)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 5 (14) 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする前記(13)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- (15) アミノ酸の $\alpha$ 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b)H又は炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸を含有する前記(1)、(2)、(3)、(5)、(7)または(8)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 15 (16) 修飾アミノ酸が、アミノ酸の $\alpha$ 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、カルバミド又はチオカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b)炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入したアミノ酸である前記(1)、(2)、(4)、(5)、(6)、(7)、(9)、(10)または(12)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 20 (17) エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する前記(1、2、3、5、7または8)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 25 (18) アミノ酸の側鎖の官能基がエステル結合を形成することにより修飾された修飾アミノ酸を有する前記(1)、(2)、(4)、(5)、(6)、

(7)、(9)、(10)、(11) または (12) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(19) アミノ酸の側鎖の水酸基に脂肪酸がエステル結合したアミノ酸を有する前記 (17) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(20) 脂肪酸が、アミノ酸の側鎖の水酸基にエステル結合又はメルカプト基にチオエステル結合したアミノ酸を有する前記 (18) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(21) 炭素数が2乃至35である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記 (19) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(22) 脂肪酸が炭素数2乃至35である前記 (20) のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(23) 炭素数が2、4、6、8、10、12、14、16および18の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記 (21) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(24) 脂肪酸が炭素数2、4、6、8、10、12、14、16および18の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸である前記 (22) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(25) 結合した脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (23) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(26) 脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (24) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(27) 結合した脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (23) 記載のペプチ

ド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(28) 脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記 (24) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 5 (29) 前記 (1) 乃至 (28) 記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端に、更に塩基性アミノ酸が結合していることを特徴とするペプチド系化合物、

- (30) N末端が炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又はC末端のカルボキシル基のOHがOZ又はNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub> (Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す) であることを特徴とする前記 (1), (2), (3), (5), (7), (8), (13), (14), (15), (17), (19), (21), (23), (25), (27) 項記載のペプチド系化合物、
- 10 15

- (31) アミノ末端のアミノ基が、炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル基又はアシル基の導入により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基のOHがOZ又はNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub> (Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基を示し、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す、) であることを特徴とする前記 (1), (2), (4), (5), (6), (7), (9), (10), (11), (12), (16), (18), (20), (22), (24), (26), (28), (29) 項記載のペプチド系化合物、
- 20

- 25 (32) 前記 (30) または (31) 記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端アミド誘導体に、更に塩基性基を導入したことを特徴とする

ペプチド系化合物、

(33) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物、

5 (34) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(35) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための医薬組成物、

10 (36) ヒト以外の動物に適用するための前記(33)乃至(35)記載の医薬組成物、

(37) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(38) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

20 (39) ヒト以外の動物に適用するための前記(37)又は(38)記載の治療方法、

(40) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAであって、当該DNAがコードするアミノ酸配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチド

25 をコードする塩基配列を有する当該DNA、

(41) 塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21、24、

- 36、37、38および39記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列である前記(40)記載のDNA、
- (42)塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21、24、36、37、38および39記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列中、アミノ酸をコードしている塩基配列である前記(40)記載のDNA、
- (43)前記(40)乃至(42)記載のDNAを有するベクター、
- (44)前記(43)記載のベクターを含有する細胞、
- (45)前記(40)乃至(42)記載のDNAを有するベクターを有し、
- 10 且つ当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として産生することができる細胞、
- (46)前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物に対する抗体、
- (47)前記(46)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(32)記載
- 15 のペプチド系化合物を検出することを特徴とする前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアッセイ方法、
- (48)前記(46)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物の検出用キット、
- 20 (49)前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(40)乃至(42)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取
- 25 することからなる前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(50) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(40)乃至(42)記載のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(51) 前記(19)乃至(28)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、脂肪酸をアミノ酸の側鎖の水酸基にエステル結合又はメルカプト基にチオエステル結合させる活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記(19)乃至(28)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(52) 配列番号8記載のアミノ酸配列中のセリンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるセリンアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記(19)乃至(28)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(53) 配列番号28記載のアミノ酸配列中のトレオニンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記(19)乃至(28)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(54) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

(55) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配

列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(56) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、および

(57) 前記(1)乃至(32)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

20 に関する。

また具体的には、本発明は、

(1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドの少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されていることを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(2) (a) 配列番号2記載のアミノ酸配列又は(b)当該配列において

少なくともアミノ末端から４番目乃至１０番目までのアミノ酸配列を有し、かつ該アミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記（１）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 5     （３）配列番号３、４、５、８、９、１０、１１、１２、１３、１６、１７、１８、１９、２２、２３、２５及び２６記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記（２）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 10    （４）細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドの（ａ）構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ（ｂ）少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 15    （５）配列番号２７記載のアミノ酸配列を有する前記（１）又は（４）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

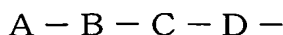
- 20    （６）（ａ）配列番号２記載のアミノ酸配列又は（ｂ）当該配列において少なくともアミノ末端から４番目乃至１０番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から４番目乃至１０番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記（４）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 25    （７）配列番号３、４、５、８、９、１０、１１、１２、１３、１６、１７、１８、１９、２２、２３、２５及び２６記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記（６）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- （８）アミノ末端の１番目から４番目に至るまでのアミノ酸配列に相当



する部分が、下記の式で表される前記（１）又は（４）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、



A；アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

5 B；アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

（ただし、A + Bの分子鎖長がジペプチド相当長ある、）

C又はD；同一であっても異なってもよく、（a）修飾されたアミノ酸、（b）疎水性側鎖を有するアミノ酸、又は（c）塩基性側鎖を有するアミノ酸、

10 を表す、

（９）配列番号２、３、８、９、１０、１１、１６、１７、２２、２５及び２６記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列において、アミノ末端の１番目から４番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が前記（８）に記載のペプチド系化合物であるペプ

15 チド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（１０）修飾アミノ酸が、アミノ酸の $\alpha$ 炭素に、（a）炭素数１以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、カルバミド又はチオカルバミド結合を介して炭素数が１若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、

20 又は（b）炭素数１以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入したアミノ酸である前記（１）乃至（９）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（１１）アミノ酸の側鎖の官能基がエステル結合を形成することにより修飾された修飾アミノ酸を有する前記（１）乃至（１０）記載のペプチ

25 ド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（１２）アミノ酸の側鎖の水酸基又はメルカプト基に、脂肪酸がエステ

ル結合したアミノ酸を有する前記（１１）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（１３）脂肪酸が炭素数２乃至３５である前記（１２）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- ５ （１４）脂肪酸が炭素数２、４、６、８、１０、１２、１４、１６および１８の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸である前記（１２）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- （１５）脂肪酸がオクタン酸（octanoic acid）、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記（１２）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、
- 10

（１６）脂肪酸がデカン酸（decanoic acid）、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記（１２）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- （１７）アミノ末端のアミノ基が、炭素数１以上の飽和あるいは不飽和アルキル基又はアシル基の導入により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基のOHがOZ又はNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>（Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基を示し、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す、）であることを特徴とする前記（１）乃至
- 15

- （１６）記載のペプチド系化合物、
- 20

（１８）前記（１）乃至（１６）記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端に、更に塩基性アミノ酸が結合していることを特徴とするペプチド系化合物、

- （１９）前記（１）乃至（１６）、又は（１８）記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端アミド誘導体に、更に塩基性基を導入したことを特徴とするペプチド系化合物、
- 25

(20) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物、

- (21) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(22) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための医薬組成物、

- 10 (23) ヒト以外の動物に適用するための前記(20)乃至(22)記載の医薬組成物、

(24) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

- 15 (25) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

- 20 (26) ヒト以外の動物に適用するための前記(24)又は(25)記載の治療方法、

(27) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAであって、当該DNAがコードするアミノ酸配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該DNA、

- 25 (28) 塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列である前記

- (27) 記載の DNA、
- (29) 塩基配列が、配列番号 6、7、14、15、20、21 および 24 記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列中、アミノ酸をコードしている塩基配列である前記 (27) 記載の DNA、
- 5 (30) 前記 (27) 乃至 (29) 記載の DNA を有するベクター、
- (31) 前記 (30) 記載のベクターを含有する細胞、
- (32) 前記 (27) 乃至 (29) 記載の DNA を有するベクターを有し、
- 且つ当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、
- 当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチ
- 10 ド系化合物として産生することができる細胞、
- (33) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物に対する抗体、
- (34) 前記 (33) 記載の抗体を用いて前記 (1) 乃至 (19) 記載
- のペプチド系化合物を検出することを特徴とする前記 (1) 乃至 (19)
- 記載のペプチド系化合物のアッセイ方法、
- 15 (35) 前記 (33) 記載の抗体を用いて前記 (1) 乃至 (19) 記載の
- ペプチド系化合物を検出することを特徴とする前記 (1) 乃至 (19) 記
- 載のペプチド系化合物の検出用キット、
- (36) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換
- え技術を用いて製造する方法において、前記 (27) 乃至 (29) 記載
- 20 の DNA を含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつ
- のアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得ら
- れた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取
- することからなる前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物の製
- 造方法、
- 25 (37) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換
- え技術を用いて製造する方法において、前記 (27) 乃至 (29) 記載

の DNA を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする前記（１）乃至（１９）記載のペプチド系化合物の製造方法、

- 5     （３８）前記（１２）乃至（１６）記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、アミノ酸の側鎖の水酸基又はメルカプト基に、脂肪酸をエステル結合させる活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記（１２）乃至（１６）記載のペプチド系化合物の製造方法、
- 10    （３９）配列番号 ８ 記載のアミノ酸配列中のセリンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるセリンアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記（１２）乃至（１６）記載のペプチド系化合物の製造方法、  
      （４０）前記（１）乃至（１９）記載のペプチド系化合物のアミノ酸配  
15    列をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、
- 20    （４１）前記（１）乃至（１９）記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することが  
25    できる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(42) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、および、

(43) 前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、  
にも関する。

15 また、具体的には、本発明は

(1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

20 (2) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的  
25 に許容される塩、

(3) 配列番号3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、

17、18、19、22および23記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記(2)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(4) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有し、(a)構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ(b)少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(5) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記(4)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(6) 配列番号3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22および23記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記(4)乃至(5)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(7) 修飾されたアミノ酸がアミノ末端から3番目のアミノ酸である前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(8) 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする前記(7)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(9) アミノ酸の $\alpha$ 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミ

ド又はカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b) H又は炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸を含有する前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 5 (10) エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(11) 脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(10)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 10 (12) 炭素数が2乃至35である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(11)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(13) 炭素数が2、4、6、8、10、12、14、16および18の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(12)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 15 (14) 結合した脂肪酸がオクタン酸(octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(13)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(15) 結合した脂肪酸がデカン酸(decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(13)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 20 (16) アミノ末端が炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基のOHがOZ又はNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>(Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す)であることを特徴とする前記(1)乃至(15)項記載のペプチド系化合物、
- 25



(17) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物、

(18) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(19) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物、

(20) ヒト以外の動物に適用するための前記(17)乃至(19)記載の医薬組成物、

(21) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(22) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる当該疾患の治療方法、

(23) ヒト以外の動物に適用するための前記(21)乃至(22)記載の治療方法、

(24) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物に係る DNA であって、当該 DNA の塩基配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該 DNA、

(25) 配列番号 6、7、14、15、20、21 および 24 記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列を有する前記(24)記載の DNA、

- (26) 配列番号6、7、14、15、20、21および24記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列のうち、アミノ酸をコードしている部分の配列を有する前記(24)記載のDNA、
- (27) 前記(24)乃至(26)記載のDNAを有するベクター、
- 5 (28) 前記(27)記載のベクターを含有する細胞、
- (29) 前記(24)乃至(26)記載のDNAを有するベクターを有し、且つ当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として産生することができる細胞、
- 10 (30) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物に対する抗体、
- (31) 前記(30)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を同定することを特徴とする当該ペプチド系化合物のアッセイ方法、
- (32) 前記(30)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(16)記載
- 15 のペプチド系化合物を検出することを特徴とする当該ペプチド系化合物の検出用キット、
- (33) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(24)乃至(26)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつ
- 20 のアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法、
- (34) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(24)乃至(26)記載
- 25 のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化

学的に修飾することを特徴とする当該方法、

- (35) 前記(11)乃至(15)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、配列番号8記載のアミノ酸配列中のセリン残基に脂肪酸が結合したペプチドとして産生することができる細胞を用いることを特徴とする製造方法、

- (36) 前記(4)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取することを特徴とする、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物の製造方法、

- (37) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

- (38) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

- (39) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又

は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、および、

- (40) 前記(1)乃至(16)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、
- 10 にも関する。

また、具体的には、本発明は、

- (1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、
- 15 容される塩、

(2) 配列番号1記載のアミノ酸配列を有する前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- (3) 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から7番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、
- 20 アミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記

(4) 配列番号3記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から7番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記

- (1) 記載のペプチド類縁体又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、
- 25 に許容される塩、

(5) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列、又は当該配列中の アミノ末端から 28 番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記 (3) 記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

- 5 (6) 配列番号 5 記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から 28 番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記 (4) 記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

- 10 (7) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

- 15 (8) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有し、少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換された前記 (7) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(9) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列を有する前記 (7) 乃至 (8) 記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

- 20 (10) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列、又は当該配列中の アミノ末端から 7 番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記 (7) 乃至 (8) 記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

- 25 (11) 配列番号 3 記載のアミノ酸配列、又は当該配列中の アミノ末端から 7 番目のアミノ酸迄の配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前

記（７）乃至（８）記載のペプチド系化合物又はそれらの誘導体並びにそれらの薬学的に許容される塩、

（１２）配列番号４記載のアミノ酸配列、又は当該配列中の アミノ末端から 28 番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記（１０）記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

（１３）配列番号５記載のアミノ酸配列、又は当該配列中のアミノ末端から 28 番目のアミノ酸迄のアミノ酸以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を有する前記（１１）記載のペプチド系化合物の前駆体ペプチド系化合物、

（１４）修飾されたアミノ酸がアミノ末端から 3 番目アミノ酸である前記（１）乃至（６）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（１５）修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする前記（１４）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（１６）修飾アミノ酸における修飾が、アミノ酸の  $\alpha$  炭素において、（a）炭素数 1 以上のアルキル鎖を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は（b）H 又は炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を示す前記（１）乃至（６）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（１７）エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する前記（１）記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

（１８）脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記（１７）記載のペプチ

ド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(19) 炭素数が2乃至35である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(20) 結合した脂肪酸がカプリル酸 (caprylic acid)、又はそのモノ  
5 エン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(21) 結合した脂肪酸がカプリン酸 (capric acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

10 (22) 結合した脂肪酸がラウリン酸 (lauric acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(18)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(23) アミノ末端が炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又はカルボキシル末端がOZ又はNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>(Z  
15 は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す)により修飾されたことを特徴とする前記(1)乃至(22)項記載のペプチド系化合物、

(24) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的  
20 に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(25) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物、

25 (26) ヒト以外の動物に適用するための前記(24)乃至(25)記載の医薬組成物、

(27) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

- (28) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、
- 5 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる当該疾患の治療方法、

(29) ヒト以外の動物に適用するための前記(27)乃至(28)記載の治療方法、

- 10 (30) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物に係る DNA であって、当該 DNA 配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする DNA 配列を有する当該 DNA、

(31) 配列番号6記載の DNA 配列を有する前記(30)記載の c DNA (NCR 含む)

- 15 (32) 配列番号6記載の DNA 配列における31番目から381番目までの DNA 配列を有する前記(30)記載の c DNA (NCR 含まない)、

(33) 配列番号7記載の DNA 配列を有する前記(30)記載の c DNA (NCR 含む)、

- (34) 配列番号7記載の DNA 配列における34番目から385番目までの DNA 配列を有する前記(30)記載の c DNA (NCR 含まない)、
- 20

(35) 前記(30)乃至(34)記載の DNA を有するベクター、

(36) 前記(35)記載のベクターを含有する細胞、

- (37) 前記(30)乃至(34)記載の DNA を有するベクターを有し、且つ当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、
- 25 当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチド系化合物として産生することができる細胞、



(38) 前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物に対する抗体、  
(39) 前記(38)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物を同定することを特徴とする当該ペプチド系化合物のアッセイ方法、

- 5 (40) 前記(38)記載の抗体を用いて前記(1)乃至(23)記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする当該ペプチド系化合物の検出用キット、

- (41) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(30)記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法、
- 10

- (42) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記(30)記載のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする当該方法、
- 15

- (43) 前記(18)乃至(22)記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、配列番号1記載のアミノ酸配列中のセリン残基に脂肪酸が結合したペプチドとして産生することができる細胞を用いることを特徴とする製造方法、
- 20

- (44) 前記(7)乃至(13)記載のペプチド系化合物をコードするDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取することを特徴とする、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌
- 25

を誘導する活性を有するペプチド系化合物の製造方法、

(45) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードする DNA  
を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

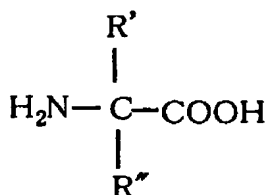
(46) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードする DNA  
を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾され  
うる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有することをペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(47) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードする DNA  
を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、および、

(48) 前記(1)乃至(6)記載のペプチド系化合物をコードする DNA  
を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾され  
うる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有することをペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、  
にも関する。

本発明において、アミノ酸とはL-アミノ酸、D-アミノ酸、 $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$ -アミノ酸、 $\gamma$ -アミノ酸、天然アミノ酸、合成アミノ酸等あらゆるアミノ酸を含む。

本発明において修飾アミノ酸とは、上記アミノ酸の任意の基が化学修飾されているアミノ酸を意味する。特に、 $\alpha$ -アミノ酸における $\alpha$ 炭素が化学修飾されている修飾アミノ酸が好ましい。すなわち、修飾アミノ酸は、 $\alpha$ -アミノ酸を式(1)



で表したとき、 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ はH又は任意の置換基でよくて、要するに天然アミノ酸を化学修飾したものならどのようなものでもよい。なお、 $\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ のいずれか一方はHでもよい。

$\text{R}'$ 、 $\text{R}''$ で示される置換基としては、天然のアミノ酸に存在する置換基を、天然のアミノ酸又はそれに対応するD-アミノ酸に存在しない置換分で置き換えたアミノ酸を修飾アミノ酸と称す。

そのような置換分として、例えば天然に存在するアミノ酸が側鎖に-OH、-SH、-NH-又は-NH<sub>2</sub>を含む場合、これらをアシル化して形成される基が好適な例として挙げられる。

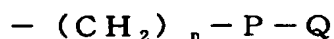
そのためのアシル基としては、例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除去して形成される基が挙げられる。

有機カルボン酸としてはより具体的には、脂肪酸が挙げられ、その炭素数は好ましくは2～35、より好ましくは6～18、最も好ましくは8～16である。そのような脂肪酸としては、具体的には、オクタン酸(好ましくは、カプリル酸)、デカン酸(好ましくは、カプリン酸)、ド

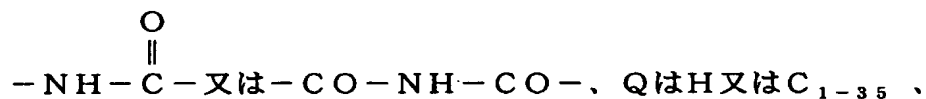
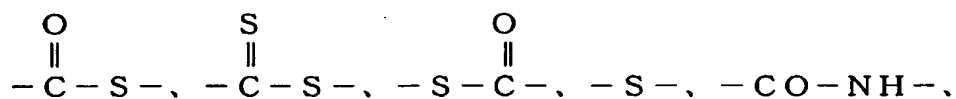
デカン酸（好ましくは、ラウリル酸）、それらのモノエン又はポリエン脂肪酸等が挙げられる。

有機スルホン酸または有機リン酸化合物についても、その炭素数は2～35のものが好ましい。

- 5 又、さらに修飾アミノ酸は上記の R' 又は / 及び R'' で示される基を例えば式



(式中、nは0～10の整数、Pは $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-$ 、 $-O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$ 、 $-O-$ 、



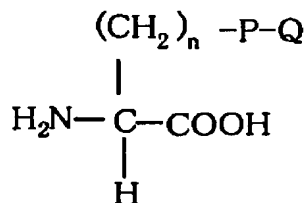
好ましくは  $C_{1-20}$  のアルキル)

で置き換えたアミノ酸であってもよい。さらにPは $-CO-$ でもよい。

- さらに、Pは $-S-S-$ 、又は $-NH-CS-$ であってもよい。又上  
10 記全ての $-NH-$ において、Hが $C_{1-35}$ の飽和又は不飽和アルキル基、 $C_{6-20}$ のアリール基、 $C_{7-13}$ のアラルキル基で置換されていてもよい。

$\alpha$ -アミノ酸を上記式(1)で表した場合に、R' 又は R'' を上記の $-(CH_2)_n-P-Q$ で置き換えた修飾アミノ酸は好ましい実施の態様である。  
特にアミノ酸がセリンの $\alpha$ 炭素に上記の式の $-(CH_2)_n-P-Q$ で示

- 15 される置換基が結合した式



(式中、n、PまたはQは上記定義に同じ。)

で示される修飾セリンが好ましい。

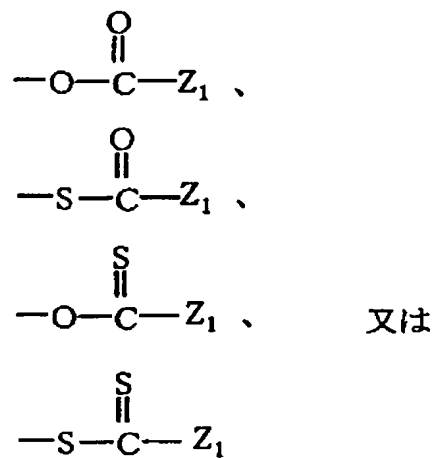
- 炭素数1以上のアルキル基を介して又は介さずエステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から結合様式についてさらに説明する。

- 例えば、アミノ酸がセリン、トレオニン、チロシン又はオキシプロリンである場合は、そのアミノ酸は側鎖に水酸基を有する。アミノ酸がシステインである場合は、そのアミノ酸は側鎖にメルカプト基を有する。アミノ酸がリジン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、プロリン又はオキシプロリンである場合は、側鎖にアミノ基又はイミノ基を有する。

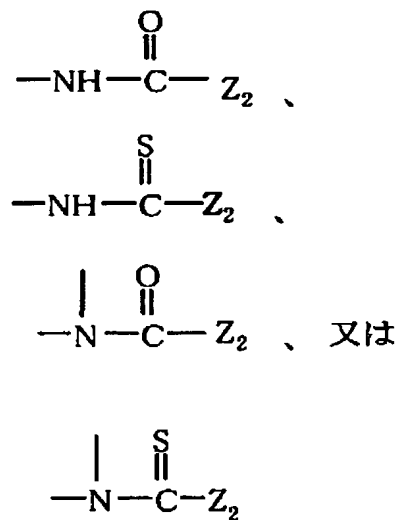
- これらの水酸基、メルカプト基、アミノ基、イミノ基は化学修飾されていてもよい。すなわち水酸基又はメルカプト基はエーテル化、エステル化、チオエーテル化又はチオエステル化されていてもよい。イミノ基はイミノエーテル化、イミノチオエーテル化、アルキル化されていてもよい。アミノ基はアミド化、チオアミド化又はカルバミド化されていてもよい。

- また、メルカプト基はジスルフィド化されていてもよく、イミノ基はアミド化、又はチオアミド化されていてもよく、アミノ基はアルキル化又はチオカルバミド化されていてもよい。

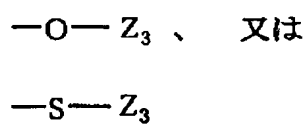
そのように化学修飾された水酸基又はメルカプト基は例えば式



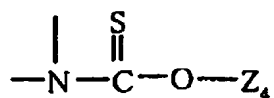
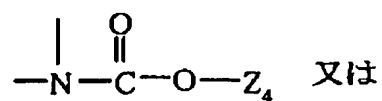
で表わすことができ、アミド化又はチオアミド化されたアミノ基又はイミノ基は



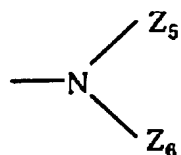
5 で表わすことができ、エーテル化された水酸基又はメルカプト基は式、



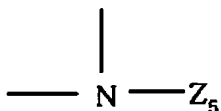
で表わすことができ、イミノエーテル化又はイミノチオエーテル化されたイミノ基としては式



で表わすことができ、アルキル化されたアミノ基として式

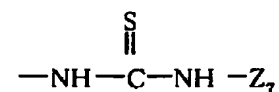
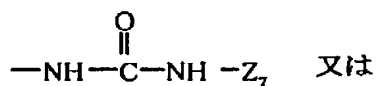


で表わすことができ、アルキル化されたイミノ基として式

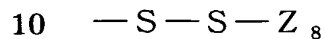


5

で表わすことができ、カルバミド化又はチオカルバミド化されたイミノ基として式



で表わすことができ、ジスルフィド化されたメルカプト基は、式



10

表わすことができる。

上記式中、 $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 、 $Z_6$ 、 $Z_7$ 及び $Z_8$ は本発明の精神に反しない限り、どのような化学修飾のための置換基であってもよいが、医薬品分野で常用されるあるいはペプチドのための化学修飾のための置換基が

15 特許文献上又は学術文献上もよく知られているので、本発明においても

そのような自体公知の修飾のための置換基を採用することができ、かつ化学修飾はそのような従来公知の方法に従って行われてよい。

- 上記式において、 $Z_1$  は水素原子又は直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基であってよく、かかるアルキル基は飽和であっててもよく、不飽和であっててもよい。炭素数は通常は  $C_{1-50}$ 、好ましくは  $C_{6-20}$  である。

$Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 、 $Z_6$ 、 $Z_7$  又は  $Z_8$  は水素原子又は直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基であってよく、かかるアルキル基は飽和又は不飽和であってよい。炭素数は通常  $C_{1-10}$ 、好ましくは  $C_{1-6}$  である。

- かかる  $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 、 $Z_6$ 、 $Z_7$  又は  $Z_8$  で表されるアルキル基は、例えば、水酸基、アミノ基、ハロゲン、ニトロ、 $C_{1-3}$  のアルコキシ基等通常ペプチドの化学修飾に使われる置換基で置換されていてもよい。

上記において、



- の残基である場合は、脂肪酸が結合したアミノ酸の一例である。その場合の脂肪酸としては、例えばカプリル酸、カプリン酸、ララリン酸、酪酸、カプロン酸、ウンデシル酸、パルミチン酸、デカン酸、ノナデカン酸、ベヘン酸、モンタン酸、若しくはラクセン酸などの飽和脂肪酸、例えばアクリル酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、若しくはアアテアロール酸などの不飽和脂肪酸が挙げられる。不飽和脂肪酸はモノエンであってもよいし、ポリエンであってもよい。

又さらに、修飾アミノ酸は  $\alpha$ -アミノ酸の炭素に  $\alpha$  炭素に結合する、ペプチド結合を構成するカルボキシル基とアミノ基以外の基を水素原子又は飽和又は不飽和アルキル基で置換することにより形成される  $\alpha$ -アミノ酸であってもよい。



又さらに、本発明において修飾アミノ酸は、アミノ酸のアミノ基に炭素数 1 乃至 6 の飽和又は不飽和アルキル基で置換することにより形成されるアミノ酸であってもよい。

本発明における非天然アミノ酸としては、アミノ基とカルボキシル基を分子の両端に有するものであって、例えば、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ 、又は  $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH}$  等が挙げられる。これらはいずれも、分子鎖長がジペプチド相当長であるが、分子鎖長がペプチド相当長のものも当然含まれる。

また、本発明における非アミノ酸化合物としては、例えば、 $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_3$ （いずれも、分子鎖長がペプチド相当長）、又は  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CH}_3$ 、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_3$ （いずれも、分子鎖長がジペプチド相当長）等も含まれる。

ここで、R は、天然アミノ酸の側鎖又は上述した修飾アミノ酸の  $\alpha$  炭素の置換基を表す。

15

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、グレリンのラット胃抽出物からの精製を示す図で、CHO-GHSR62 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の上昇による蛍光強度の変化は黒棒で示してある。a は、40 g ラット胃より調製した SP-III 画分の Sephadex G-50 (fine) によるゲル濾過の結果を示す図で、活性画分が分子量約 3,000 ダルトンであることを示している。b は、2 回目の CM-イオン交換 HPLC の結果を示す図で、55～56 分に溶出される活性画分は、逆相 HPLC でさらに精製した。

第 2 図は、グレリンにおける n-オクタノイル修飾を同定したことを示す。a は、天然型グレリン（上段）、及び合成グレリンと合成脱アシル化グレリン（下段）、各々 2  $\mu\text{g}$  を逆相 HPLC で分析した結果を示す図であ

25

る。b は、天然型グレリン（実線）、合成グレリン（小破線）及び合成脱アシル化グレリン（大破線）による、CHO-GHSR62 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

第 3 図は、グレリンの CHO-GHSR62 細胞に対する特異的な相互作用を示す図で、図中、矢印で示した点で試料を添加した。a は、グレリン、GHRP-6 および GRF (GHRH) による CHO-GHSR62 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図である。b は、GHS-R の特異的阻害剤である [D-Lys-3]-GRP-6 を添加 (○) あるいは非添加 (●) 時の、グレリンによる CHO-GHSR62 細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図で、GRF (GHRH) による細胞内カルシウムイオン濃度の変化（黒三角）も示してある。

第 4 図は、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列、およびこれら前駆体の各種組織での発現を調べた結果を示す図である。a は、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列を比較した図で、図中、同一アミノ酸は網掛け、点線はシグナルペプチド、黒三角はシグナルペプチドの切断点、三角はカルボキシル末端側の切断点、ボックスは成熟型グレリン部分、\* は n-オクタン酸による修飾を示す。b は、ラット各種組織におけるグレリンの発現をノザンプロットによって解析した結果を示す図である。

第 5 図は、in vitro および in vivo におけるグレリンの下垂体ホルモン分泌に及ぼす効果を示す図である。a は、ラット下垂体初期培養細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化による蛍光強度の変化を示した図で、実線はグレリン、破線は脱アシル化グレリンを添加した場合を示す。b は、グレリンによる下垂体ホルモンの分泌を示す図で、図中、黒棒はグレリン添加時、白棒はグレリン非添加時の下垂体ホルモン濃度を示す。c は、雄ラットにグレリンを静脈注射した後の血漿中の下垂体

ホルモン濃度の経時変化を示す図である。図 b および図 c 中で、GH は成長ホルモン、ACTH はアドレノコルティコトロピン、FSH はフォリクル、LH はルテナイジングホルモン、PRL はプロラクチン、TSH はチロイド促進ホルモンを表す。

- 5      第 6 図は、グレリンを脳室内投与した時の食用増進を示す図で、グレリン投与後 2 時間の摂餌量（平均値±標準誤差）で示してある。a はグレリンの効果についての誤差範囲が 0.0001 未満であることを示している。

- 10      第 7 図は、ウレタン麻酔ラットでの薬剤投与による胃酸分泌への効果を示す図で、A はラットグレリン（rGhrelin）、B はヒスタミン（Histamine）を投与した場合の結果である。各シンボルは 4 例のラットにおける平均値を表し、標準誤差をエラーバーで示した。対照として生理食塩水（Saline）を投与した。矢印の時点で薬剤（Drug）を投与した。

- 15      第 8 図は、ウレタン麻酔ラットでの胃運動に及ぼすラットグレリンの作用を示す図で、A は生理食塩水（Saline）およびラットグレリン（rGhrelin）を投与したときの典型的な胃運動波形を示し、B は 4 例のラットにおける平均値を標準誤差値とともに示した図である。矢印の時点で薬剤（Drug）を投与した。

- 20      第 9 図は、ラジオイムノアッセイの標準曲線および抗体の交差反応性  
25      を示す図で、a は  $^{125}\text{I}$  で標識したラットグレリンの N 端側抗体への結合の各種グレリンによる阻害を示す図であり、b は  $^{125}\text{I}$  で標識したラットグレリンの C 端側抗体への結合の各種グレリンによる阻害を示す図である。グラフの横軸は、各種グレリンの反応チューブあたりの添加量を示し、縦軸は各種グレリン非存在下でのラットグレリンの結合量（ $B_0$ ）に対する各種グレリン存在下での結合量（B）の百分率（%）で示した。図中のシンボルは、ラットグレリン（○）、ヒトグレリン（●）、ラット

グレリン-27(□)、[Ser3(decanoyl)]-ラットグレリン(◇)、[Ser3(hexanoyl)]-ラットグレリン(△) および脱脂肪酸ラットグレリン(▼)を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 5     GHS レセプター (GHS-R) の内在性リガンドとなるペプチドについては、GHS-R を発現している細胞に各種臓器又は組織の抽出物を添加し、細胞内カルシウムイオン濃度を測定することにより、当該内在性リガンドの臓器・組織間での分布を知ることができる。

- 10     GHS-R を発現している細胞としては、恒常的に GHS-R を発現していることが知られている視床下部及び脳下垂体、及びそれらの組織由来の細胞株があるが、GHS-R 遺伝子を適当な細胞、例えば CHO 細胞に導入・発現させた形質転換細胞が望ましい。

- 15     本願発明の内在性 GHS ペプチドにおいては、該ペプチドが発現している視床下部及び脳下垂体ではなく、消化器系の臓器である胃の抽出物に強い Ca 上昇活性が認められた。従って、目的のオーファン・レセプターの内在性リガンドを見いだすためには、該レセプターが発現している組織・臓器ばかりではなく、他の組織・臓器も広く探索することが必要である。

- 20     細胞内カルシウムイオン濃度の測定法は公知の方法が利用できるが、望ましくは、カルシウムイオン濃度変化による Fluo-4 AM (Molecular Probe 社)の蛍光強度の変化を利用した FLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices 社)がよい。

Ca 上昇活性が確認された組織・臓器の抽出物から、目的の内在性 GHS ペプチドを生成するためには、公知の精製方法を用いることができる。

- 25     ペプチドの精製法としては、各種分画法による分画後、ゲル濾過、イオン交換及び逆相クロマトグラフィーを、単独又は組み合わせて用いる

が有効であるが、必ずしも該クロマトグラフィーによる精製にこだわる必要はなく、ペプチドの精製に有効である手段は何でも利用可能である。

また、組織・臓器よりペプチドを単離・精製する際には、組織・臓器に存在するプロテアーゼの作用による目的ペプチドの分解を防止するために、組織・臓器を沸騰水中で熱処理することによりプロテアーゼを失活させることが望ましい。熱処理し組織・臓器を氷冷除去することも、目的ペプチドの抽出・精製に効果がある。

精製された Ca 上昇活性を有するペプチドが、*in vitro* 及び *in vivo* で GH 分泌誘導活性を確認するためには、公知の方法を利用することができる。

例えば *in vitro* では、GH を分泌して GHS-R の発現も確認されている脳下垂体細胞に添加して、細胞培養液中に分泌される GH を、抗 GH 抗体を用いたラジオイムノアッセイによって測定することができる。また上記ラジオイムノアッセイ法において、抗 GH 抗体の代わりに他のホルモンに対する抗体を用いれば、該ホルモンの分泌量も測定できる。

*in vivo* での GH 分泌誘導活性を確認するためには、Ca 上昇活性を有するペプチドを動物の末梢静脈に注射した後の血清中の GH 濃度を測定すればよい。

精製されたペプチドの構造解析には、公知の方法が使用可能である。

ペプチドのアミノ酸配列を決定するためには、エドマン分解法によりカルボキシル末端より逐次アミノ酸残基を遊離して、該遊離アミノ酸を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によってアミノ酸を同定する方法、及び該方法を自動化したアミノ酸シーケンサーによる方法がある。

また、GC-MASS によってイオン化したフラグメントの分子量を測定することにより、アミノ酸配列を決定する方法もある。

本願発明の 1 つである修飾アミノ酸を含有するペプチドの場合は、上

記アミノ酸配列を決定する際に修飾アミノ酸が「未知アミノ酸」と同定される。

この場合、当該修飾ペプチドをアミノ酸単位に分解後、修飾アミノ酸を分離・精製して、常用される化合物構造決定法によって修飾アミノ酸を構造決定し、ペプチド全体の構造を知ることができる。また、修飾ペプチドをコードする cDNA から得られる該ペプチドのアミノ酸配列を有するペプチドを化学合成し、当該合成非修飾ペプチドと修飾ペプチドの分子量や物性等から修飾基の構造を推定する方法もある。

構造決定されたペプチド中での、Ca 上昇活性に必要な部分のアミノ酸配列（コア配列）は、該ペプチドをプロテアーゼで切断して生成するペプチド断片の Ca 上昇活性を測定することによって明らかにされる。

用いられるプロテアーゼは、切断するペプチドのアミノ酸配列に特異性の高いプロテアーゼを用いてよいが、特異性が低くても部分分解の条件で反応させることにより該ペプチドから様々なペプチド断片が調製できる。

このようにして調製されたペプチド断片の Ca 上昇活性を測定することにより、Ca 上昇活性に必須のコア配列を知ることができる。

内在性 GH 分泌誘導ペプチドは、アミノ末端から 3 番目のセリンが脂肪酸によりアシル化されているが、内在性 GH 分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列の一部をもったペプチド断片および当該ペプチド断片のセリンの側鎖に脂肪酸がエステル結合した脂肪酸修飾ペプチドは化学的に合成することもできる。

該合成ペプチド断片により内在性 GH 分泌誘導ペプチドについて詳細に解析できる。同時に、種々の脂肪酸で修飾したペプチド断片を比較することにより、Ca 上昇活性に必要な脂肪酸の種類を決めることができる。

例えばアフリカツメガエルなど種によっては、内在性 GH 分泌誘導ペ

チドは、アミノ末端から3番目アミノ酸残基がセリンではなくトレオニンであり、かかるトレオニンが脂肪酸によりアシル化されているが、かかるペプチド系化合物についても合成することもでき、該化合物を詳細に解析できる。

- 5      また、脊椎動物における GH 分泌誘導活性を有するペプチドのアミノ酸配列を比較することにより、脊椎動物で広く保存されている領域を見いだし、該領域のアミノ酸配列から GH 分泌誘導活性に必須のコア配列を見いだすことができる。

- 10      内在性 GH 分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列を持つ DNA を化学合成し、該 DNA をプローブとして該ペプチドが発現している細胞の mRNA から作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングして、当該ペプチドをコードする cDNA を取得することができる。

- 15      しかし、アミノ酸に対応するコドンは縮重しており、ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列が多くなり、このような多種類の塩基配列からなる合成 DNA をプローブとしたスクリーニングが困難になることがある。

- 20      そのような場合で、当該ペプチドのアミノ酸配列と一致する配列が、配列データベースにおいて公開された発現 DNA 断片 (EST; Expressed Sequence Tag) の塩基配列から想定されるアミノ酸配列にある場合は、該 EST の塩基配列の一部からなる DNA を合成して、上記 cDNA ライブラリーのスクリーニングに用いることもできる。

また、cDNA からゲノム DNA を取得することは、常用される方法で行うことができる。

- 25      このようにして取得された cDNA の塩基配列から、内在性 GH 分泌誘導ペプチドの前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列が明らかにされる。

当該アミノ酸配列を解析することにより、シグナルペプチド、内在性

GH 分泌誘導ペプチド及びその他のペプチド部分、及びこれらのペプチドの切断点が明らかになり、内在性 GH 分泌誘導ペプチドの生成機構が明らかになる。

5      なお、本願発明の 1 つである内在性 GH 分泌誘導ペプチドの一部のアミノ酸配列、当該ペプチドの前駆体ポリペプチドのアミノ酸配列及び該ポリペプチドをコードする DNA の塩基配列が、国際出願公開 W0 98/42840 において開示されているが、該出願で開示されたペプチドはモチリン (motilin) 様活性を有する 14 アミノ酸からなるペプチドであり、本願発明で開示された Ca 濃度上昇活性や GH 分泌誘導活性については記載がない。  
10

本願発明に係るペプチド系化合物とは、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、次式 (2) で示される構造において、少なくとも 1 つアミノ酸が修飾アミノ酸で置換されているペプチド、又は少なくとも 1 つのアミノ酸が非アミノ酸で置換されたペプチド類縁体、及びそれらのアミノ末端及び/又はカルボキシル末端が修飾されたペプチド誘導体をいう。  
15

本発明において、上記のペプチド、ペプチド類縁体及びペプチド誘導体をペプチド系化合物と総称する。

また、当該ペプチド系化合物において、複数のアミノ酸が修飾アミノ酸及び/又は非アミノ酸で置換されてもよい。本発明においては、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、通常アミノ末端から 1 ~ 10 番目、好ましくはアミノ末端から 1 ~ 4 又は 1 ~ 5 番目のアミノ酸の 1 又は複数が修飾アミノ酸及び/又は非アミノ酸で置換されているのが好適である。中でも、1 ~ 5 番目のアミノ酸が修飾アミノ酸及び/又は非アミノ酸で置換されているのが好適である。  
20  
25

又、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、アミノ末端から 1



～4番目以外の部分で、好ましくは1～6番目以外の部分で、より好ましくは1～10番目以外の部分でのアミノ酸の1又は複数が欠失又は付加されていてもよい。

本発明のペプチド系化合物は好ましくは細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び生体内で成長ホルモンの分泌を誘導するペプチドであって、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換された化合物である。

すなわち、本発明におけるペプチド系化合物は、細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性又は／及び生体内成長ホルモン分泌誘導作用を有し、ペプチド鎖においてアミノ酸が修飾アミノ酸又は／及び非アミノ酸化合物で置換されたペプチド系化合物である。

そのような化合物の具体例として配列番号1、2又は3が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物、配列番号4又は5が示すペプチドにおいて第25番目アミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

また、他の具体例としては、配列番号10、11、16又は17が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

さらに他の具体例としては、配列番号22、25、26又は27が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

またさらに他の具体例としては、配列番号29、30又は31が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

また、配列番号28が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Thr

の水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

本発明におけるアシル化によって水酸基に導入されるアシル基は例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除  
5 去して形成される基である。

有機カルボン酸としてはより具体的には、脂肪酸が挙げられ、その炭素数は好ましくは2～35程度、より好ましくは6～18程度、最も好ましくは8～16程度である。そのような脂肪酸としては、具体的には、  
10 オクタン酸（好ましくは、カプリル酸）、デカン酸（好ましくは、カプリン酸）、ドデカン酸（好ましくは、ラウリル酸）、それらのモノエン又はポリエン脂肪酸等が挙げられる。

有機スルホン酸、有機リン酸化合物として、その炭素数が2～35程度のものが好ましい。

第3番目のSerの水酸基がアシル化されている配列番号1のアミノ酸  
15 配列を含む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許容される塩も本発明における好ましい実施の態様である。

すなわち、本願発明の第2は、配列番号8に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号1に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号9に記載のアミノ酸配列において第3番目のSerの水酸基がアシル化され  
20 ている脂肪酸修飾ペプチド含む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許容される塩も本発明における好ましい実施の態様である。

また、配列番号8に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号1に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号9に記載のアミノ酸配列のアミノ末端から3番目のアミノ酸残基セリンをトレオニンに変換したア  
25 ミノ酸配列において第3番目のThrの水酸基がアシル化されている脂肪酸修飾ペプチド含む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許

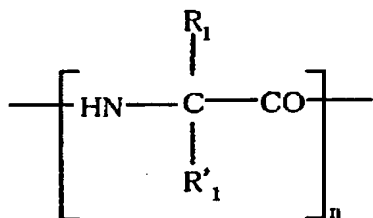
容される塩も本発明における好ましい実施の態様である。

さらに又、本発明の好ましい実施の態様は下記一般式（２）で表される化合物又はその薬理学的に許容される塩である。



- 5   〔式中、X は、アミノ末端アミノ酸のアミノ基の水素原子に相当する部分で、H 又は炭素数が 1 又は複数の飽和又は不飽和アルキル又はアシル基を表す。Y はカルボキシル末端アミノ酸の  $\alpha$ -カルボキシル基の水酸基に相当する部分で、OH、OZ 又は NR<sub>6</sub>R<sub>7</sub>（Z は薬理学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基を表し、R<sub>6</sub> 又は R<sub>7</sub> は H 又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基を表し、R<sub>6</sub> と R<sub>7</sub> とは同一又は異なってもよい。）を表す。〕
- 10

ここで、AA1 は、式



- （式中、n は 1 又は 2 を表し、R<sub>1</sub> と R<sub>1</sub>' は、同一であっても異なってもよく、水素又は置換基を表す。）
- 15   で表される。

ただし、n が 2 のときは、その二つの置換基、R<sub>1</sub> は同一であってもよいし異なってもよい。又、R<sub>1</sub>' についても同様である。

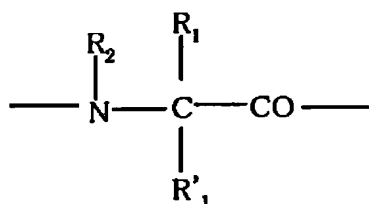
- 置換基の具体例としては、（１）炭素数 1 以上のアルキル鎖を介し又は介せず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数 1 以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖、（２）H 又は炭素数 1 以上の飽和も
- 20

しくは不飽和アルキル鎖、又は（３）天然アミノ酸の側鎖等が挙げられる。

また、炭素数１以上のアルキル鎖を介し又は介せず、ジスルフィド又はチオカルバミド結合で結合する炭素数１以上の飽和もしくは不飽和ア

5 ルキル鎖であってもよい。

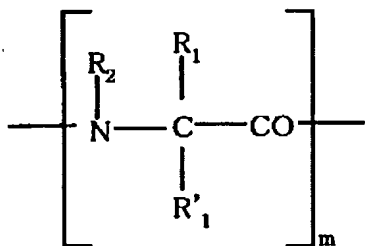
AA 2 は、式



（式中、 $\text{R}_1$  と  $\text{R}'_1$  は前記と同意義。 $\text{R}_2$  は、H 又は炭素数 1 乃至 6 の飽和或いは不飽和アルキル基を表す。）

10 又は、 $\text{---CH}_2\text{---CH}(\text{R}_1)\text{---CH}_2\text{---}$ 、或いは  $\text{---CH}_2\text{---CH}(\text{R}_1)\text{---CO---}$  ( $\text{R}_1$  は前記と同意義) を表す。

AA 3 は、式



（式中、 $m$  は 1 以上の整数を表し、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}'_1$  又は  $\text{R}_2$  は、前記と同意義。）

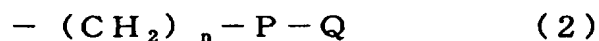
15 ただし、 $m$  が 2 以上の整数のときは、その二つの置換基、 $\text{R}_1$  は同一であってもよいし異なってもよい。又  $\text{R}'_1$ 、 $\text{R}_2$  についても同様である。

X で示される炭素数が 1 以上の飽和又は不飽和アルキルとしては具体的にはメチル、エチル、 $n$ -プロピル、 $i$ -プロピル、 $n$ -ブチル、 $s$ -ブチル、 $t$ -ブチル、 $n$ -ヘプチル、 $n$ -ヘキシル、 $n$ -デシル、ピ

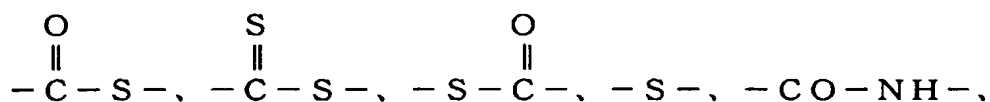
ニル、プロパニル又はヘキセニル等の  $C_{1-20}$  のアルキルが好ましい。

X で示されるアシルとしては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、若しくはベンゾイル等の  $C_{1-10}$  カルボン酸アシル；又はベンゼンスルホニルナフタレンスルホニル等の  $C_{7-13}$  のスルホン酸アシルが挙げられる。

- 5  $R_1$  又は  $R_1'$  で示される基は例えば式 (2)



(式中、n は 0 ~ 10 の整数、P は  $\begin{array}{c} O \\ || \\ -C-O- \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} O \\ || \\ -O-C- \end{array}$ 、 $-O-$ 、



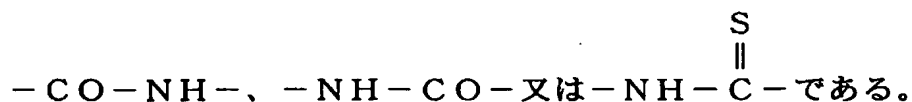
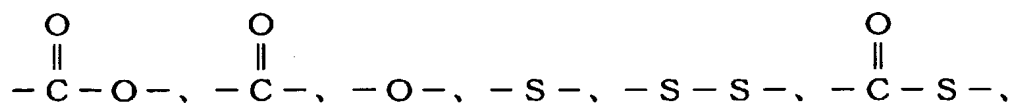
$-NH-CO-$  又は  $-CO-NH-CO-$  を表し、Q は H 又は上記した X で

示される  $C_{1-20}$  のアルキルを表す。)

- 10 で示される基が好ましい。さらに P は  $-CO-$  でもよい。

さらに、P は  $-S-S-$ 、又は  $-NH-CS-$  であってもよい。また、上記全ての  $-NH-$  において、H が  $C_{1-35}$  の飽和又は不飽和アルキル基、 $C_{6-20}$  のアリール基で、 $C_{7-13}$  のアラルキル基で置換されていてもよい。

- 15 より好ましくは、P は



また、 $R_1$  又は  $R_1'$  で示される基は、P を介さずに  $-(CH_2)_n$  に Q が結合している基であってもよい。

Z、R6 又は R7 で示される低級のアラルキル基としては、例えばメチル、

エチル、*n*-プロピル、*i*-プロピル、*n*-ブチル、*s*-ブチル、*t*-ブチル、*i*-ブチル、*n*-ペンチル又は*n*-ヘキシル等の $C_{1-6}$ のアルキルが好ましい。

次に、本願発明に係るペプチド化合物の好ましい態様を以下に示す。

- 5 (1) AA1 の好ましい態様；(ア) アミノ酸又はペプチド。例えば、Ser、Gly-Ser 又は  $-NH-(CH_2)_3CH(CH_2OH)CO-$  (2 アミノ酸残基間のペプチド結合部分が  $-(CH_2)_2-$  である場合) 等が挙げられる。(イ) 一級アミン。例えば、 $-NH-(CH_2)_3CH(CH_2OH)CH_2-$  (2 アミノ酸残基間のペプチド結合部分が  $-(CH_2)_2-$  である場合)、 $-NH-(CH_2)_3CH(R_1)CH_2-$  (2 アミノ酸残基間のペプチド結合部分が  $-(CH_2)_2-$  である場合) [  $R_1$  は前記と同意義。]、  
10  $-NH-CH(CH_2OH)CH_2-$  等が挙げられる。

また、(ア) アミノ酸又はペプチドとして、 $NH_2-(CH_2)_4-COOH$ 、 $NH_2-C(CH_3)_2-(CH_2)_3-COOH$ 、又は  $NH_2-CH(CH_3)-(CH_2)_2-CH(CH_3)-COOH$  も挙げられる。

- 15 (2) AA2 の好ましい態様；(ア) アミノ酸。例えば、Ser、homoSer、Cys、homoCys、Asp、Glu、Lys、Ala、Val、Leu、homoLeu、Ile、homoIle、オルニチン、アミノアジピン酸、メチオニン、エチオニン、ブチオニン、又は *S*-メチルシステイン等が挙げられるが、特に Ser が好ましい。  
(イ) アミノ酸残基以外の構造；  $-CH_2-CH(R_1)-CO-$ 、 $-CH_2-CH(R_1)-CH_2-$   
20 等が挙げられる ( $R_1$  は前記と同意義。)

- 特に、(a) 疎水性側鎖を有するロイシン、バリン、ノルロイシン、ホモロイシン、ホモイソロイシン、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン等、あるいは、これらの *N*-メチルアミノ酸が好ましい。また (b) 側鎖にアシル基、アルキル基、  
25 アルケニル基あるいはアラルキル基で修飾が可能な官能基を有する、セリン、ホモセリン、トレオニン、システイン、ホモシステイン、アスパ

ラギン酸、グルタミン酸、アジピン酸、リジン、オルニチンなど、およびこれらの *N*-メチルアミノ酸が好ましい。

これら (b) のアミノ酸側鎖に、エステル、アミド、ジスルフィド、エーテル、チオエーテル、チオエステル、カルバミドまたはチオカルバミド結合を介し、アシル基、アルキル基、アルケニル基あるいはアラルキル基が結合する。また、アミノ酸の  $\alpha$  炭素にアルキル、アラルキル基が結合してもよい。

(3) AA3 の好ましい態様 ; アミノ酸又はペプチド。例えば、Phe 又は配列番号 2 又は 3 記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から 4 番目の Phe から 28 番目の Arg までのアミノ酸配列を有するペプチド若くは当該配列のカルボキシル末端側のアミノ酸が、配列番号 2 又は 3 記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から 5 番目の Leu まで 1 つずつ欠失したペプチド。

例えば、

- 15 Phe Leu、  
Phe Leu Ser、  
Phe Leu Ser Pro、  
Phe Leu Ser Pro Glu、  
Phe Leu Ser Pro Glu His、
- 20 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln、
- 25 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys、

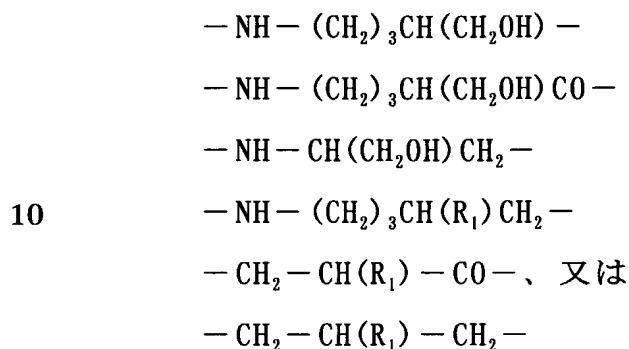
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu,  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser,  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys,  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys,  
5 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
Pro,  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
Pro  
Pro,  
10 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
Pro  
Pro Ala,  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
Pro  
15 Pro Ala Lys,  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
Pro  
Pro Ala Lys Leu,  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
20 Pro  
Pro Ala Lys Leu Gln,  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
Pro  
Pro Ala Lys Leu Gln Pro、又は、  
25 Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys  
Pro



Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg、

が AA3 の例として挙げられる。

又さらに、AA3 の例示において、アミノ酸は L-アミノ酸でも D-アミノ酸でもよいことはいうまでもない。又、AA3 の上記例示において、例えば 1～数個のアミノ酸（好ましくはアミノ酸配列の約 3 分の 1 程度まで）は、非天然アミノ酸又は非アミノ酸単位、例えば



（上記式中  $\text{R}_1$  は前記と同意義）

で置き換えられてもよい。上記式で示される基が AA3 に複数個あり、しかも  $\text{R}_1$  で示される基が複数個ある時、それらは同一又は異なる。

又、さらに、AA3 の例示における各アミノ酸のいずれも上記  $\text{R}_1$  で示される置換基を有してよい。AA3 で示される基において、 $\text{R}_1$  が複数個存在する時は、それらは同一であっても異なってもよい。

以下にペプチドを構成するアミノ酸が側鎖に水酸基、メルカプト基、イミノ基又はアミノ基を有する場合の当該側鎖の好ましい例を示す。なお、以下の  $\text{R}_8$  は炭素数 1 以上の飽和又は不飽和アルキル鎖を示す。かかるアルキル鎖は  $\text{X}$  で示される上記のアルキル鎖と同意義でよい。

- ア) Ser の側鎖； $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}_8$  又は  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_8$ 、  
 イ) homoSer の側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}_8$  又は  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}_8$ 、  
 25 ウ) Cys の側鎖； $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\text{R}_8$  又は  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}_8$ 、  
 エ) homoCys の側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\text{R}_8$  又は  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}_8$ 、

- オ) Asp の側鎖 ;  $-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{R8}$  又は  $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R8}$ 、  
カ) Glu の側鎖 ;  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{R8}$  又は  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R8}$   
キ) Lys の側鎖 ;  $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{R8}$ 、  
ク) アミノアシピン酸の側鎖 ;  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{R8}$  又は  
5  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R8}$ 、  
ケ) オルニチンの側鎖 ;  $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{R8}$   
コ) 側鎖がアルキル鎖のアミノ酸である Ala、Val、Leu、ホモロイシン、  
Ile、ホモイソロイシン、S-メチルシステイン、メチオニン、エチオニン、  
又はブチオニン等についても同様にアルキル基が上記のように式  
10 (2) で示される修飾されたアルキル基であってよい。

又、さらに本発明は、配列番号 2 又は 3 のアミノ酸配列において、アミノ末端から 13、14 又は 15 番目までのアミノ酸からなる部分ペプチドを含有する細胞内カルシウムイオン濃度上昇剤もしくは GH 分泌誘導剤も、好ましい実施の態様として含むものである。この場合の部分ペプチドを構成する各アミノ酸単位は必ずしも化学修飾されている必要はない。

さらに又、本発明の好ましい実施の態様は下記のペプチド系化合物である。

なお、グレリン誘導体とは天然型グレリンの化学構造を一部改変したペプチド系化合物のことをいい、短鎖グレリンとは 27 ないし 28 アミノ酸からなる天然型グレリンの一部のアミノ酸が欠失して、27 ないし 28 よりも少ないアミノ酸からなるペプチドのことをいう。また、n 位のアミノ酸残基とはアミノ末端から n 番目のアミノ酸残基のことを示す。

グレリン、あるいはその短鎖グレリン誘導体のアミノ末端アミノ酸は、該アミノ酸の  $\alpha$  アミノ基が保護されていなければ、いずれのアミノ酸（天然型グレリンではアミノ末端アミノ酸はグリシン）でもよく、また D-体、L-体のいずれでもよいが、好ましくは、アラニン、バリン、アミノイソ

ブタン酸などが好適である。

2 位残基は、いずれのアミノ酸（天然型グレリンではセリン）でもよいが、好ましくは小さな側鎖を有するアラニン、セリン、ヒスチジン、ノルバリンあるいは非アミノ酸化合物等が好適である。

- 5      1 位と 2 位残基は、アミノ酸 2 残基に相当する  $\delta$ -アミノ酸、例えば実施例で示した 5-アミノペンタン酸や、5-アミノ-5-ジメチルペンタン酸、2、5-ジアミノペンタン酸等であってもよい。

- 3 位と 4 位に選ばれるアミノ酸残基は、D-体、L-体いずれでもよく、D-あるいは L-N-メチルアミノ酸であってもよく、これらのいずれの  
10      組み合わせであってもよい。中でも、3 位が L-体、または 3 位、4 位とも L-体の組み合わせが好ましい。

- 3 位と 4 位に選ばれるアミノ酸残基の立体配置は、1 位および 2 位のアミノ酸配列により適宜選択できる。即ち、天然のグレリンの 1 位と 2 位のアミノ酸配列、Gly-Ser は 3 位と 4 位ともに L-体であることが好ましい  
15      が、他のアミノ酸配列、例えば、Aib-His 等の場合は 3、4 位がともに D-体であってもよい。また、1、2 位が 2 残基相当長の  $\delta$ -アミノ酸、例えばアミノペンタン酸である場合は、3、4 位は L-体、D-体のいずれであってもよい。

- 3 位と 4 位に選ばれるアミノ酸残基は、好ましくは、D-体あるいは L-体のロイシン、バリン、ノルロイシン、ホモロイシン、ホモイソロイシン、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、およびこれらの D-、あるいは L-N-メチルアミノ酸  
20      が好適である。

- 特に、3 位と 4 位に選ばれるアミノ酸残基は、上記疎水性アミノ酸の中でも、例えば、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニンなどの芳香族の疎水性アミノ酸がより好ましい。  
25

また、3位と4位に選ばれるアミノ酸残基としては、リジン、アルギニンまたはヒスチジンなどの塩基性アミノ酸も好ましい。なかでもリジンが好ましい。

- 5 これら塩基性アミノ酸により、グレリン分子が塩基性となり、Ca上昇活性がより向上する。

- 3位と4位に選ばれるアミノ酸残基は、側鎖にアシル基(アルカニル基、アルケノニル基もしくはアリールアルカニル基など)、アルキル基、またはアラルキル基で修飾が可能な官能基を有する、セリン、ホモセリン、トレオニン、システイン、ホモシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、  
10 アジピン酸、リジン、オルニチンなどが好適である。

これらの側鎖に反応性を有するアミノ酸は、D-体またはL-体のいずれでもよく、対応するD-あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよいが、中でも、3位がL-体、または3位、4位ともL-体の組み合わせが好ましい。

- 15 また、アミノ酸側鎖に、カルバメイト、チオカルバメイト、エステル、アミド、ジスルフィド、エーテル、チオエーテルもしくはチオエステル結合等を介し、アシル基、例えばアラカニル基(炭素数が2~35、好ましくは6~18、より好ましくは8~12)、アルケノニル基(炭素数が2~35、好ましくは6~18、より好ましくは8~12)、アリールアル  
20 カニル基(ベンゾイル、フェナセチル、フェニルブチリル、ナフトイル、ナフチルアセチルもしくはナフチルプロピオニル基など);アルキル基(炭素数が2~35、好ましくは6~18、より好ましくは8~12);または、アラルキル基(ベンジル、フェネチル、フェニルプロピル、フェニルブチル、フェニルペンチル、ナフチルメチル基等)が結合していてもよい。  
25 また、結合を介さずに、3位と4位の $\alpha$ 炭素に上記のアルキル基、アラルキル基が結合してもよい。

3 位と 4 位に選ばれるアミノ酸残基の組み合わせとしては、3 位のアミノ酸残基が疎水性の側鎖を有し、4 位のアミノ酸が疎水性アミノ酸であることが好ましい。

疎水性の側鎖を有する 3 位のアミノ酸残基としては、アミノ酸の  $\alpha$  炭素に、(a) 炭素数 1 以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエーテル、アミドまたはジスルフィド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は (b) 炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸が好ましい。特に、アミノ酸の  $\alpha$  炭素に炭素数 1 以上の飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸がより好ましい。

4 位アミノ酸のカルボキシル基が、アミド、メチルアミドもしくはエチルアミド等のアルキルアミド、またはベンジルアミド、アダマンタンアミドもしくはアダマンタンアルキルアミド等のアラルキルアミドであってもよい。

また、アルキルアミド、あるいはアラルキルアミドに、アミノ基またはグアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。かかる塩基性基としては、例えば、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{CONHCH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$  などが挙げられる。

4 位アミノ酸のカルボキシル基に、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよく、これら塩基性アミノ酸は D-体、L-体もしくはラセミ体、または D-もしくは L-N-メチルアミノ酸のいずれであってもよい。

これらのアミノ酸のカルボキシル基は、上述のように、アルキルアミドまたはアラルキルアミドであってもよい。さらに、アルキルアミドあるいはアラルキルアミドに、アミノ基、グアニジド基など塩基性基を結合してもよい。かかる塩基性基としては、上述のものなどが挙げられる。

5 位以降のアミノ酸配列は、ヒトグレリン、ラットグレリンの 5 位ロイシンを基点に 28 位まで、いずれの長さの配列が 4 位のアミノ酸に付加してもよい。

- 好ましくはグレリン (1-5)、グレリン (1-6)、グレリン (1-7)、  
5 グレリン (1-8)、グレリン (1-9)、グレリン (1-10)、グレリン (1-11) が挙げられる。なお、グレリン (m-n) とは、グレリンのアミノ末端から m 番目より n 番目までのアミノ酸配列を有するペプチドを示す。とくに、グレリン (1-5) がより好ましい。

- そのカルボキシル末端は、上述のようなアルキルアミド、またはアラ  
10 ルキルアミドであるのが好ましい。

また、アルキルアミドまたはアラルキルアミドに、さらにアミノ基またはグアニジド基などの塩基性基を結合させてもよい。かかる塩基性基としては、上述のものなどが挙げられる。

- また、5 位以降から 28 位までのいずれかのアミノ酸配列をグレリン  
15 (1-4) カルボキシル末端部に付加したカルボキシル末端部欠損グレリン誘導体のカルボキシル末端アミノ酸にアルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよい。

これら塩基性アミノ酸は D-体、L-体もしくはラセミ体、又は D-もしくは L-N-メチルアミノ酸であってもよい。

- 20 また、これらの塩基性アミノ酸のカルボキシル基が、上述のようにアルキルアミド、またはアラルキルアミドであってもよい。アルキルアミドまたはアラルキルアミドは、さらにアミノ基またはグアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。かかる塩基性基としては、上述のものなどが挙げられる。

- 25 とくに好ましい態様としては、グレリン (1-5)、グレリン (1-6)、グレリン (1-7) のカルボキシル末端アミノ酸は、D-体、L-体、又

は対応するD-もしくはL-N-メチルアミノ酸である場合が挙げられる。

また、5, 6, 7位の残基にアルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよく、これらのアミノ酸はD-体、L-体あるいはラセミ体、又はD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよい。

また、これらの塩基性アミノ酸のカルボキシル基が、上述のようなアルキルアミド、またはアラルキルアミドであってもよい。アルキルアミドまたはアラルキルアミドに、さらにアミノ基またはグアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。かかる塩基性基としては、例えば、上述のものが挙げられる。

本発明に係るペプチド化合物は、上記のように、カルボキシル末端がアルキルアミドまたはアラルキルアミドである場合、該アルキル基またはアラルキル基にさらにアミノ基が結合しているアミド誘導体であってもよく、本発明における好ましい態様の一つである。具体的には、例えば、カルボキシル末端がアミノエチルアミドである場合があげられる。

上記のように、カルボキシル末端がアミド体またはアミド誘導体である本発明に係るペプチド系化合物は、生体内でカルボキシペプチダーゼ類による酵素分解に抵抗することからも有用な化合物である。

同様に、N-メチルアミノ酸を含む本発明に係るペプチド系化合物も酵素抵抗性を有する点で有用な化合物である。

本発明に係るペプチド系化合物は常法により得ることができる。例えば、既に上述のように天然の原料から単離されるか、又は組換えDNA技術及び／または化学的合成によって製造することができる。更にアミノ酸残基に修飾（例えば、アシル化）が必要な場合は自体公知の手段に従って修飾反応を施すことができる。

本発明に係るペプチド系化合物は、より具体的には本願発明に係るペプチドをコードするDNAを有する発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、当該培養物から目的のペプチドを採取することにより本発明に係るペプチド系化合物を得ることもできる。

- 5 当該宿主細胞を選択することにより、当該細胞内において目的のペプチドにアシル化等の修飾がされた化合物を得ることができる。また、当該ペプチドが修飾されていない場合は、所望により公知の手段に従ってアシル化等の修飾反応を行えばよい。アシル化反応にはリパーゼ等の酵素を用いることもできる。
- 10 遺伝子を組み込むベクターとしては、例えば大腸菌のベクター(pBR322、pUC18、pUC19等)、枯草菌のベクター(pUB110、pTP5、pC194等)、酵母のベクター(YEp型、YRp型、YIp型)、又は動物細胞のベクター(レトロウィルス、ワクシニアウィルス等)等が挙げられるが、その他のものであっても、宿主細胞内で安定に目的遺伝子を保持できるものであれば、
- 15 いずれをも用いることができる。当該ベクターは、適当な宿主細胞に導入される。目的の遺伝子をプラスミドに組み込む方法や宿主細胞への導入方法としては、例えば、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に記載された方法が利用できる。

- 上記プラスミドにおいて目的のペプチド遺伝子を発現させるために、
- 20 当該遺伝子の上流にはプロモーターを機能するように接続させる。

- 本願発明において用いられるプロモーターとしては、目的遺伝子の発現に用いる宿主細胞に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、形質転換する宿主細胞がEscherichia属の場合はlacプロモーター、trpプロモーター、lppプロモーター、λPLプロモーター、recAプロモーター等を用いることができ、Bacillus属の場合は
- 25 SP01プロモーター、SP02プロモーター等を用いることができ、酵母の場合



合は GAP プロモーター、PH05 プロモーター、ADH プロモーター等を用いることができ、動物細胞の場合は、SV40 由来プロモーター、レトロウィルス由来プロモーター等を用いることができる。

- 上記のようにして得られた目的遺伝子を含有するベクターを用いて宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては細菌（例えば、*Escherichia* 属、*Bacillus* 属等）、酵母（*Saccharomyces* 属、*Pichia* 属、*Candida* 属等）、動物細胞（CHO 細胞、COS 細胞等）等を用いることができる。培養時の培地としては液体培地が適当であり、当該培地中には培養する形質転換細胞の生育に必要な炭素源、窒素源等が含まれることが特に好ましい。所望によりビタミン類、成長促進因子、血清などを添加することができる。

- 脂肪酸修飾ペプチドを直接製造するためには、該ペプチドの前駆体ポリペプチドを適切な位置で切断できるプロセッシング・プロテアーゼ活性を有し、当該ペプチド中のセリン残基をアシル化できる活性を有する細胞が望ましい。このようなプロセッシング・プロテアーゼ活性およびセリンアシル化活性を有する宿主細胞は、当該前駆体ポリペプチドをコードする cDNA を含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞が Ca 上昇活性又は GH 分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを産生することを確認することにより、選抜できる。

- 培養後、培養物から本発明に係るペプチドを常法により分離精製する。例えば、培養菌体又は細胞から目的物質を抽出するには、培養後、菌体又は細胞を集め、これをタンパク質変性剤（塩酸グアニジンなど）を含む緩衝液に懸濁し、超音波などにより菌体又は細胞を破碎した後、遠心分離を行う。次に上清から目的物質を精製するには、目的物質の分子量、溶解度、荷電（等電点）、親和性等を考慮して、ゲル濾過、限外濾過、透析、SDS-PAGE、各種クロマトグラフィーなどの分離精製方法を適宜組み合わせる。

本発明に係るペプチド化合物は常法により化学合成することができる。  
例えば、保護基の付いたアミノ酸を液相法及び／又は固相法により縮合、  
ペプチド鎖を延長させ、酸で全保護基を除去し、得られた粗生成物を上  
記の精製方法で精製することにより得られる。アシル化酵素又はアシル  
5 基転移酵素で選択的に目的位置にあるアミノ酸の側鎖をアシル化するこ  
ともできる。

ペプチドの製造法は従来既に種々の方法が充分に確立されていて、本  
発明のペプチド系化合物の製造もそのような自体公知の方法に従って容  
易に製造できる。例えば古典的なペプチド合成法に従ってもよいし、固  
10 相法に従ってもよい。

以下に、組換え DNA 技術と化学合成を併用した本発明に係るペプチド  
化合物の製法について例を挙げて述べる。

アミノ末端部ペプチドの活性エステル、例えば、(1)  
Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Osu、(2) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe  
15 -Osu、又は(3) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-Osu を化学合成  
し、各々、組換え DNA 技術により生産したカルボキシル末端部ペプチド  
である(4) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR、(5)  
LSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR、又は(6) SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR とを  
結合、即ち、(1)と(4)、(2)と(5)及び(3)と(6)を結合さ  
20 せて、28個のアミノ酸からなるペプチド化合物を得る。より具体的  
には、XXXXZSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR を大腸菌で発現させ、Boc<sub>2</sub>(O)でア  
ミノ基を保護し、  
Boc-XXXXZSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR を得る。次に  
アミノ酸 Z のカルボキシル末端に選択的な酵素で切り出し、  
25 NH<sub>2</sub>-SPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPR に変換する。この  
化合物と Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R10)-Phe-Leu-Osu を中性から弱アルカ

リ水溶液中で混合し、得られる BocGlySer(Bu)Ser(R10)FLSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc) LQPR をトリフルオロ酢酸処理すれば目的物が得られる。

上記アミノ酸の一文字標記は、1997年12月10日、株式会社ニュート  
5    ンプレス発行の「細胞の分子生物学第3版」の記載に従った。

また、Boc は *t*-ブチルオキシカルボニルを表し、Osu は *N*-ヒドロキシサクシンイミドの水酸基の水素が脱離したものを表し、Bu はブチル基を表し、R10 は上述した本発明に係る修飾アミノ酸の置換基を表す。

本願発明のペプチド系化合物の塩としては薬学的に許容される塩が好  
10    ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性又は酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム  
塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩；ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げら  
15    れる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリ  
エチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノール  
アミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、*N,N'*-ジベン  
ンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。

20    無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ  
酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク  
酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、*p*-トルエンス  
25    ルホン酸などとの塩が挙げられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジ

ン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

これらの塩の中でもナトリウム塩、カリウム塩が最も好ましい。

- 5      本願発明のペプチド系化合物又はその薬理学的に許容しうる塩は毒性が低く、GH 分泌誘導作用を有し、そのままもしくは自体公知の薬理学的に許容しうる担体、賦形剤、増量剤などと混合して哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対して用いることができる。投与量は成人に静脈注射する場合 1 日 0.
- 10    0.1 ~ 5 mg/kg であり、好ましくは 0.04 ~ 1.5 mg/kg である。この量を 1 日 1 回 ~ 3 回投与するのが望ましい。本願発明のペプチド系化合物は、薬学的に許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの固形製剤；又はシロップ剤、注射剤などの液状製剤として経口又は非経口的に投与することができる。
- 15    薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。

- また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用いることもできる。
- 20

賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。

- 25    結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシブ

ロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。

- 5 溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。

- 溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。
- 10

- 懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシアシルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。
- 15

等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。

- 20 緩衝剤の好適な例としては、例えばリン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩などの緩衝液などが挙げられる。

無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。

- 防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。
- 25

抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

上記医薬組成物は、GH の投与による効果と同等以上の効果をもたらし、GH の投与によって起こる様々な副作用も低減できる。

- 5 当該医薬組成物の適用可能な疾患又はその効果は、GH 欠損又は低下が関係するものとして、例えば、小人症、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化、GH 欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強、GH 欠乏症成人での運動能力の向上、小児の重度火傷治癒、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用、プレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防、
- 10 重度免疫不全症におけるT細胞「教育」の促進、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

- また、GH 欠損又は低下と直接関係しない疾患又は効果としては、例えば実施例7に記載したように、当該医薬組成物は拍動量の増加効果があるから、心不全等の心疾患の治療に効果がある。
- 15

当該医薬組成物の効果はヒトには限らない。すなわち、動物の成長促進、食肉中の脂身の低減等、GH 投与と同等以上の効果がある。

- また、例えば実施例13に記載したように、本発明に係る医薬組成物は脳室内投与および静脈内投与によって食欲増進作用があることから、
- 20 食欲不振や拒食症を治療するための食欲増進剤として用いることもできる。

- さらに、例えば実施例14に記載したように、本発明に係る医薬組成物は胃運動および胃酸分泌を促進する作用があることから、非潰瘍性消化不良、突発性軽症胃アトニー、機能性消化不良および逆流性食道炎等の胃機能性疾患の治療剤として用いることもできる。
- 25

加えて、例えば実施例15に記載したように、本発明に係る医薬組成

物は静脈内投与により、骨髄、十二指腸および空腸において細胞増殖促進作用が認められたことから、腸管粘膜保護剤、経静脈栄養時の小腸粘膜障害予防剤及び骨粗鬆症治療剤として用いることができる

- また上記医薬組成物は以下のような疾患の治療又は身体状態の改善に
- 5 効果がある。

- 例えば、高齢者における成長ホルモン放出の刺激処置、糖質コルチコイドの異化副作用の予防、オステオポロシスの予防と治療、免疫系の刺激、損傷治癒の促進、骨折修復の促進、成長遅滞の治療、成長遅滞に起因する腎不全もしくは機能不全の治療、成長ホルモン欠損児童を含む
- 10 生理学的不足状態および慢性疾患に関連した不足状態の治療、肥満および肥満に関連した成長遅滞の治療、プラダーヴィリ症候群およびターナー症候群に関連した成長遅滞の治療、火傷患者の回復の促進および入院の削減、子宮内発育遅滞、骨格形成異常、高コルチコイド症およびクッシング症候群の治療、拍動性成長ホルモン放出の誘導、ストレス患者
- 15 における成長ホルモンの代用、骨軟骨形成異常、ヌーナン症候群、精神分裂病、うつ病、アルツハイマー病、遅延損傷治癒および心理社会的剥奪の治療、肺機能不全および呼吸器依存症の治療、大手術後のタンパク質異化反応の減衰、癌やエイズ（AIDS）のような慢性疾患によるタンパク損失および悪液質の減少、膵島細胞症を含む高インスリン血症の治療、
- 20 排卵誘発のためのアジュバント療法、胸腺の発育を刺激するためおよび加齢に伴う胸腺機能の衰退を防ぐため、免疫抑制患者の治療、筋肉強度、運動性の向上、高齢者における皮膚の厚さ、代謝恒常性、腎恒常性の維持、骨芽細胞、骨再造形および軟骨成長の刺激等が挙げられる。

- また動物においても以下のような効果が期待される。例えば、動物の
- 25 成長の速度増加、動物の乳生産もしくは獣毛生産増加、ペット動物における免疫系の刺激、ペット動物における高齢疾患の治療、家畜の成長促

進並びにヒツジにおける増毛などが挙げられる。

本願発明による Ca 上昇活性又は GH 分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原とする抗体は、公知の方法により取得できる。当該抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよく、  
5 それらの取得についても公知の方法が利用できる。また、これらの抗体を用いた脂肪酸修飾ペプチドの測定方法および当該測定法を利用した測定キットの作成も公知の方法が利用できる。

また、実施例 17 に記載したように、グレリンのアミノ末端側及びカルボキシル末端側のペプチドに対する抗体を作成し、前者が 3 位セリン  
10 を修飾している脂肪酸を特異的に認識することを利用して、脂肪酸で修飾されたグレリンと脂肪酸が脱離したグレリンを分別定量することに用いることもできる。

該グレリンのアミノ末端側に対する抗体またはカルボキシル末端側のペプチドに対する抗体は、公知の方法により取得でき、モノクローナル  
15 抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよい。

同様にして、アミノ末端の 3 番目に修飾アミノ酸を有する本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩において、3 位のアミノ酸残基の側鎖、好ましくは脂肪酸を特異的に認識し、アミノ末端側のペプチドに結合する抗体を作ることにもできる。さらに、同様にし  
20 て、本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩において修飾アミノ酸を有するペプチドに特異的に結合する抗体を作ることにもできる。

上記のように、修飾アミノ酸の側鎖を特異的に認識する抗体と、修飾アミノ酸または／および非アミノ酸化合物以外のアミノ酸またはそれら  
25 を含まないペプチドを認識する抗体、好ましくは本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩のカルボキシル末端側のペ



プチドに対する抗体とを組み合わせる検査キットも本発明に含まれる。

また、該検査キットを用いて、修飾アミノ酸、好ましくはアシル化されたアミノ酸を有する本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩と、修飾アミノ酸を有しない本発明に係るペプチド系化合物またはその薬理学的に許容される塩とを分離検出するアッセイ方法も本発明に含まれる。

上記アッセイ方法または検査キットについて、具体的態様を以下に述べる。ただし、本発明は以下の態様に限られない。

- すなわち、上記アッセイ方法としては、例えば（i）本発明のペプチド系化合物等に対する抗体と、被検液中の被検物質と標識化された本発明のペプチド系化合物等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のペプチド系化合物等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明に係るペプチド系化合物等の定量法、および（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された別の本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性または／および不溶化担体上に捕捉されなかった標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法が挙げられる。上記（i）および（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のアミノ末端側を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のカルボキシル末端側に反応する抗体であることが好ましい。

- また、本発明のペプチド系化合物等のアッセイ方法として、該化合物に対するモノクローナル抗体（以下、抗タンパク質抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。

これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の  $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは  $F a b$  画分を用いてもよい。

上記抗体を用いる本発明のペプチド系化合物等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）  
5 に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサ  
10 ンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

本発明にかかるアッセイ方法のうち標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。

放射性同位元素としては、例えば、 $^{125}I$ 、 $^{131}I$ 、 $^3H$ または $^{14}C$ などが  
15 用いられる。

上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ －ガラクトシダーゼ、 $\beta$ －グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。

蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソ  
20 チオシアネートなどが用いられる。

発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。

さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

25

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法は特に

断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

#### 実施例 1. GHS-R 発現細胞株の作製と Ca 上昇活性の測定

GH 分泌誘導因子 (GHS) が GHS レセプター (GHS-R) に結合することによって生ずる細胞内カルシウムイオン濃度の上昇 (Ca 上昇活性) をアッセイするために、以下のようにしてラット GHS-R を発現している細胞株を作製した。ラット GHS-R の全長 cDNA は、ラット脳由来の cDNA を鋳型にして、RT-PCR (逆転写酵素-ポリメラーゼチェーンリアクション) によって取得した。公知のラット GHS-R の塩基配列 [K. K. McKee, et al, Molecular Endocrinology 11, 415-423 (1997).] から、以下の塩基配列からなるセンスおよびアンチセンスプライマーを合成した。

センスプライマー: 5' -ATGTGGAACGCGACCCCCAGCGA-3'

アンチセンスプライマー: 5' -ACCCCCAATTGTTTCCAGACCCAT-3'

増幅された cDNA をベクター pcDNAIII (Invitrogen 社) につなぎ、発現ベクター GHSR-pcDNAIII を作製した。当該発現ベクターで CHO 細胞を形質転換し、GHS-R を安定に発現している形質転換細胞を  $1 \mu\text{g/ml}$  の G418 を含有する培地で選択した。選択された細胞株 CHO-GHSR62 は、 $10^{-10} \sim 10^{-9}$  M の GHRP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) に応答した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化 (Ca 上昇活性) は、FLIPR システム (Molecular Device 社) で測定した。測定前に、 $4 \times 10^4$  の CHO-GHSR62 細胞を壁面が黒い 96 穴マイクロプレート (Corning 社) に植え、12~15 時間培養した。細胞を  $4 \mu\text{M}$  の蛍光色素 Fluo4 (Molecular Probe 社) と 1 時間保持し、20 mM Hepes ([N-2-hydroxyethyl]-piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid]) と 2.5 mM プロベネシドを含む Hank's BSS (Hank's Balanced Salt Solution) で 4 回洗浄し、試料を添加して蛍光の変化を測定することによって、Ca 上昇活性をアッセイした。

## 実施例 2. 内在性 GH 分泌誘導ペプチドの精製

実施例 1 に記載した CHO-GHSR62 細胞を用いて、ラット由来の各種組織・臓器について、Ca 上昇活性を調査した結果、ラット胃由来のペプチド抽出物が 0.5 mg 相当でも強い Ca 上昇活性を有することがわかった。

- 5   そこで、数種類のクロマトグラフィーを用いて、ラット胃抽出物から以下の方法で Ca 上昇活性を有するペプチドを精製した。

新鮮なラットの胃 40 g を、混在するプロテアーゼを失活するために、5 倍量の沸騰水中で 5 分間煮沸した。冷却後、煮沸した試料を 1M AcOH-20 mM HCl に調整し、ポリトロン・ミキサーを用いてペプチドを抽出した。

- 10   抽出液を 11,000 rpm、30 分間遠心し、上清をエバポレーターで約 40 ml に濃縮した。濃縮液にアセトンを 66% になるように添加して、アセトン沈殿を行い、生じた沈殿を除去した後、上清のアセトンを蒸発させた。上清を、0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) で平衡化した 10 g の Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters 社製) に加え、10% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA で洗浄後、
- 15   60% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA で溶出した。溶出液の溶媒を蒸発後、凍結乾燥を行った。試料を 1M AcOH に溶解して、1M AcOH で平衡化した SP-Sephadex C-25 (H<sup>+</sup>型) に吸着させた。1M AcOH、2M ピリジンおよび 2M ピリジン-AcOH (pH 5.0) で段階的に溶出することによって、SP-I、SP-II および SP-III の 3 つの画分を、それぞれ得た。SP-III 画分を Sephadex G-50 ゲル濾過カラ
- 20   ムに掛け、各々の画分の一部について CHO-GHSR62 細胞を用いた Ca 上昇活性のアッセイを行った。Sephadex G-50 カラムクロマトグラフィーの結果を第 1a 図に示したが、分子量約 3,000 に相当する活性画分 (第 1a 図中、フラクション 43-48) を、TSK CM-2SW カラム (4.6 x 250 mm、Tosoh 社製) を用い pH 6.4 で、CM-イオン交換による HPLC (高速液体クロマト
- 25   グラフィー) で分画した。CM-HPLC での活性画分を、同一カラムを用い、pH 4.8 で二次 CM-HPLC で分画した (第 1b 図)。活性画分 (第 1b 図中、

溶出時間 55-56 分) を、 $\mu$  Bondasphere C-18 カラム (3.9 x 150 mm、Waters 社製) を用いた逆相 HPLC で単一にまで精製した。40 g のラットから 16  $\mu$ g の Ca 上昇活性を有するペプチドを精製し、グレリン (ghrelin) と命名した。

5

### 実施例 3. グレリンの構造解析

精製したラット由来のグレリンのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー (ABI 494、Applied Biosystems 社) で決定した。グレリンは、Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser  
10 Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg (Xaa は未同定アミノ酸) の配列からなる 28 アミノ酸残基で構成されるペプチドであった。Xaa はラット cDNA の塩基配列から Ser であり、当該ペプチドにおいては Ser が何らかの修飾を受けていることがわかった。

そこで、アミノ末端から 3 番目のセリンが修飾されていない非修飾グレリンをペプチド合成機 (ABI 433A、Applied Biosystems 社) で化学合成した。非修飾合成グレリンの逆相 HPLC での溶出時間は、天然型グレリンと大きく異なっていた (第 2a 図) ので、非修飾合成グレリンは天然型グレリンよりも著しく親水性であることがわかった。

15 以上の結果から、天然型グレリンのアミノ末端から 3 番目のセリン (セリン 3) は疎水性の残基で修飾されていることがわかった。

セリン 3 の修飾基を明らかにするために、精製したグレリンを電子スプレーイオン化マス分析機 (ESI-MS) 分析した。観測された天然型グレリンの分子量 ( $3314.9 \pm 0.7$ ) は、cDNA の塩基配列から得られた非修飾グレリンペプチドの分子量 (3188.5) よりも 126 大きかった。以上の結果から、天然型グレリンはセリン 3 の水酸基が n-オクタノイル (C8:0) 脂肪酸で修飾されているとわかった。

25

このことを確認するために、n-オクタノイル (C8:0) グレリンペプチドを化学合成して、逆相 HPLC での溶出時間を調べた。n-オクタノイル (C8:0) ペプチドの化学合成は、セリン 3 の水酸基以外の全ての官能基を保護したペプチドをペプチド合成機 (ABI 433A、Applied Biosystems 社) を用いて Fmoc 固相法で合成し、セリン 3 の水酸基を 4-(ジメチルアミノ)ピリジンの存在下で、n-オクタン酸とエチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドでアシル化して合成した。合成した n-オクタノイルペプチドは精製した天然型グレリンと同一の溶出時間であった (第 2a 図)。さらに、合成 n-オクタノイルペプチドおよび天然型グレリンをキモトリプシン処理によって得られる、アミノ末端から 4 番目までのペプチド断片 (Gly 1- Phe 4) は、逆相 HPLC で同一の溶出時間を示した。

以上の結果から、ラット由来の天然型グレリンは配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有し、セリン 3 の水酸基が n-オクタン酸 (カプリル酸) でアシル化された構造 (第 2c 図) であると結論された。

また、ヒトグレリンをヒト胃抽出物から精製し、その構造が配列番号 3 に記載したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から 3 番目のセリン側鎖の水酸基が n-オクタン酸 (カプリル酸) でアシル化された構造であることがわかった (第 4a 図)。

なお、上記ラット及びヒト由来のグレリンの構造は、第 1b 図中の活性画分のうち最初のピーク画分 (溶出時間 55-56 分) 精製したものの構造であるが、第 1b 図の他の活性画分についても精製後、上記と同様の方法で構造解析を行った結果、セリン 3 を修飾している脂肪酸はカプリル酸 (C8:0) 以外に、カプリル酸のモノエン酸 (C8:1)、カプリン酸 (C10:0) およびそのモノエン酸 (C10:1)、およびラウリル酸 (C12:0) およびそのモノエン酸 (C12:1) があることがわかった。

また、ニワトリ、ウナギ及びカエルのグレリンを実施例 2 と同様にして胃抽出物から精製し、さらに実施例 3 と同様にして構造解析した。その構造は、ニワトリのグレリンは配列番号 2 5 に記載したアミノ酸配列、ウナギのグレリンは配列番号 2 6 に記載したアミノ酸配列、カエルのグレリンは配列番号 2 7 に記載したアミノ酸配列を有し、いずれもアミノ末端から 3 番目のセリン側鎖の水酸基が n-オクタン酸（カプリル酸）でアシル化された構造であることがわかった。

さらに、アフリカツメガエル、ニジマス及びイヌのグレリンを実施例 2 と同様にして胃抽出物から精製し、さらに実施例 3 と同様にして構造解析した。

その構造は、アフリカツメガエルのグレリンは配列番号 2 8 に記載したアミノ酸配列、ニジマスのグレリンは配列番号 2 9 および 3 0 に記載したアミノ酸配列、イヌのグレリンは配列番号 3 1 に記載したアミノ酸配列を有し、いずれもアミノ末端から 3 番目のセリン側鎖またはトレオニン側鎖の水酸基が n-オクタン酸（カプリル酸）でアシル化された構造であることがわかった。

なお、ニジマスからは、配列番号 2 9 に記載した 2 3 アミノ酸残基からなるグレリン-2 3 と、配列番号 3 0 に記載した 2 0 アミノ酸残基からなるグレリン-2 3 とが得られた。

20

#### 実施例 4. グレリンの Ca 上昇活性

天然型グレリンおよび n-オクタノイル修飾合成グレリンは Ca 上昇活性を有していたが、非修飾合成グレリンは Ca 上昇活性を顕著には示さなかった（第 2b 図）。また、n-オクタン酸又は n-オクタン酸と非修飾合成グレリンの混合物は Ca 上昇活性を顕著には示さなかったことから、天然型グレリンの n-オクタン酸基は Ca 上昇活性に重要な構造であること

25

がわかった。以後、グレリンとは[0-n-オクタノイル-セリン 3]-グレリン (第 2c 図) のことを示す。

グレリンは、CHO-GHSR62 細胞において、GHRP-6 よりも高い細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性 (Ca 上昇活性) を示したが、GHRH (GH 放出ホルモン、第 3a 図では GRF) は Ca 上昇活性を示さなかった (第 3b 図)。グレリンの Ca 上昇活性は  $10^{-11}$  M から認められ、 $EC_{50}$  は 2.5nM であった。GHS-R の特異的アンタゴニストである [D-Lys 3]-GHRP-6 [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)]  $10^{-4}$  M の存在下で、グレリンによる Ca 上昇活性は抑制され、高濃度のグレリンで、アンタゴニスト非存在下での Ca 上昇活性に回復する (第 3b 図)。以上の結果は、グレリンの Ca 上昇活性が GHS-R の特異的アンタゴニストによって拮抗的に阻害されることを示している。

#### 実施例 5. グレリン前駆体 cDNA とその各種臓器での発現

グレリンのアミノ酸配列は公知のいかなるペプチドのアミノ酸配列とも相同性を示さなかったが、GenBank データベースをホモロジー検索したところ、ラット EST (Expressed Sequence Tag) 配列の 1 つ (GenBank 受理番号 AI549172) に同一の配列が認められた。この EST 配列を基に以下の PCR プライマーを合成した。

センスプライマー: 5' -TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA-3'

アンチセンスプライマー: 5' -AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'

ラット胃由来の cDNA を鋳型に上記の 2 つプライマーを用いて RT-PCR を行った。PCR の条件は、1 サイクルが 98 °C で 10 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間を、35 サイクル行った。増幅された DNA 断片をプローブとして、ラット胃 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。約  $2 \times 10^5$  の組換えファージをスクリーニングして、ラット由来グレリンをコー



ドする全長 cDNA を取得した。

ラットグレリン cDNA は、配列番号 6 に記載した 501 塩基からなり、117  
アミノ酸（第 4a 図）からなるグレリン前駆体（prepro-ghrelin）をコー  
ドしていた。グレリン前駆体のアミノ末端の 23 アミノ酸残基はシグナル  
5 ペプチドの性質を備えていた。グレリンはグリシン 24 から始まり、成熟  
型グレリンの最後の 2 つのアミノ酸（Pro-Arg）は、プロテアーゼによる  
切断を受ける配列であった。

ラットグレリン cDNA を用いて、低ストリンジェント条件でヒト胃 cDNA  
ライブラリーをスクリーニングして、全長ヒトグレリン cDNA を取得した。  
10 ヒト胃 cDNA ライブラリーは、ヒト胃 poly(A)<sup>+</sup>RNA（Clontech 社）から、  
cDNA 合成キット（Pharmacia 社）を用いて作製した。取得した全長ヒト  
グレリン cDNA は、配列番号 7 に記載した 511 塩基からなり、117 アミノ  
酸（第 4a 図）からなるヒトグレリン前駆体（prepro-ghrelin）をコード  
していた。ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列は、  
15 82.9%の同一性を示し、グレリンは生物種間で高度に保存されていること  
が判明した。

グレリンの組織間分布を知るために、ラットの種々の組織から単離さ  
れた poly(A)<sup>+</sup>RNA を解析した（第 4b 図）。ラット組織のノザンブロッ  
ト解析によって、0.62 kb のグレリン前駆体 mRNA が胃に認められた。心  
20 室（Ventricle）にも 2 本のかすかなバンドが認められたが、これらは  
6.2 kb および 1.2kb の mRNA で、胃での mRNA よりも大きく、胃とは異な  
った mRNA のスプライシングが推定された。以上の結果からグレリンの主  
な発現部位は胃であることがわかった。

## 25 実施例 6. グレリンの下垂体ホルモン分泌への効果

グレリンが GH 分泌誘導活性を有しているかを *in vitro* および *in vivo*

で調べた。まず *in vitro* でのアッセイとして、下垂体前葉の初期培養細胞へのグレリンの効果を調べた。4週令の雄 SD ラットから下垂体前葉を採取し、コラゲナーゼ処理で分散させた後、細胞を集め、10%FCS（ウシ胎児血清）と抗生物質を含む DMEM（Dulbecco's modified Eagle's Medium）培地で2回洗浄し、DMEM 培地に懸濁して、下垂体前葉初期培養細胞を調製した。5 x 10<sup>4</sup> の細胞を、ポリ-D-リジンでコートした 96 穴の細胞培養プレートに植え、3~4 日培養した。培養液を 0.1 ml の試料を含有する DMEM 培地と交換し、37℃で15分間保持した。培養液の一部を採取して、ラジオイムノアッセイによって、培養液中の各種下垂体ホルモンの濃度を測定した。下垂体ホルモンのうち、GH、FSH、LH、PRL、TSH は Biotrak/Amersham 社製のキットを用い、ACTH は Peninsula Laboratories 社製の高感度 EIA キットを用いた。

グレリンを下垂体前葉初期培養細胞に添加すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が認められ、非修飾合成グレリンでも弱いながらも Ca 上昇活性が認められた（第 5a 図）。この結果は、グレリン及び非修飾合成グレリンが下垂体細胞に直接作用することを示している。次に、下垂体前葉初期培養細胞を用いてグレリンが GH 分泌誘導活性を調べたところ、10<sup>-6</sup> M のグレリンの添加により、培養液中の GH 濃度だけが濃度依存的に増加し、他の下垂体ホルモン（FSH、LH、PRL、TSH）の濃度増加は認められなかった（第 5b 図）。

グレリンの GH 分泌誘導活性を *in vivo* で調べた。合成グレリン 10 μg を雄ラット（250 g）の静脈に注射後、60 分まで経時的に血液を採取して、血漿中の下垂体ホルモンの濃度を上記ラジオイムノアッセイによって測定した。下垂体ホルモンの内、GH だけが血液中に放出され、グレリンの静脈注射後 5~10 分で最高値に達した。この結果から、胃から血液中に放出されたグレリンが下垂体前葉細胞に作用し、血液中に GH を放出

することがわかり、グレリンが未同定だった特異的な内在性 GH 分泌誘導物質であることが確認された。

#### 実施例 7. ラットでの心拍出量増加

- 5 麻酔下ラットを用いて心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を調べた。体重 220-250g の Wistar 系雄性ラット（ケアリー）を用い、心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を検討するためラットを無作為に 4 群（10, 1, 0.5, 0.2  $\mu$ g 投与群）に分けた。グレリンは生理食塩水で希釈し、ラット 1 匹あたりの投与量を、10, 1, 0.5, 0.2  $\mu$ g に調整
- 10 して、心拍出量測定のため右総頸静脈に挿入したインジェクションチューブ（PE50）から 120  $\mu$ l 急性投与した。

- 動力学的指標として全身血圧、心拍出量を測定し、さらに末梢血管抵抗値を算出した。ラットをペントバルビタールで麻酔後、背位に固定した。平均血圧測定のために、右大腿動脈にヘパリンで満たしたポリエチレンカ
- 15 ニューレ（PE50）を挿入した。心拍出量の測定は熱希釈式心拍出量計（CARDIOTHER M500R）を用いて測定した。右総頸静脈に生理食塩水で満たしたインジェクションチューブ（PE50）を挿入し、右心室内で留置した。右総頸動脈からマイクロカテーテルを挿入し、大動脈起始部に留置した。注入液は室温（25℃）の生理食塩水 100  $\mu$ l を用いた。熱希釈式心拍出量
- 20 計の MEASURE スイッチを押すと同時に注入液（生理食塩水 100  $\mu$ l）を注入し、心拍出量を測定した。測定は 5 回行いその平均値を心拍出量とした。平均血圧および心拍出量は、グレリン投与前、投与後 1、5、15、30 分の値を測定した。末梢血管抵抗は平均血圧を心拍出量で除して算出した。

第 1 表

	体重 (g)	グレリン1 $\mu$ g投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
		0分	1分	5分	15分	30分
平均	230	347	382	367	341	338
SEM	3.7	14.3	10.2	11.5	7.9	8.8

表中、S E Mは平均値の標準誤差 (Standard Error Heans) を表す。

第2表

	体重 (g)	グレリン10 $\mu$ g投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
		0分	1分	5分	15分	30分
平均	237	350	390	392	370	344
SEM	1.0	8.5	7.4	15.8	14.7	13.8

5 表中、S E Mは平均値の標準誤差 (Standard Error Heans) を表す。

グレリン1 $\mu$ g投与群 (第1表) 及びグレリン10 $\mu$ g投与群 (第2表) おいて、投与後1分及び5分で、心拍出量の増加が認められた

#### 実施例8. 各種起源からのグレリンおよびグレリン-27の単離

- 10 ラット胃抽出物から実施例2に記載した方法でCa上昇活性を指標にグレリンを精製した。二次CM-HPLCでの活性画分 (第1b図中、溶出時間59分) を、 $\mu$ Bondasphere C-18カラム (3.9 x 150 mm、Waters社製) を用いた逆相HPLCで単一にまで精製した。この画分を電子スプレーイオン化マス分析機 (ESI-MS) 分析した結果、分子量 (3187.2 $\pm$ 0.9) のピークが観測されたが、この値は28アミノ酸からなりオクタン酸 (C8) 修飾
- 15 された天然型グレリンよりも約126小さかった。このペプチドのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー (ABI 494、Applied Biosystems社) で決定したところ、Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala

Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg (Xaa  
は未同定アミノ酸)の配列からなる 27 アミノ酸残基で構成されるペプチ  
ドであった。すなわち、28 アミノ酸で構成されるグレリンのアミノ末端  
から 13 番目又は 14 番目のグルタミンが 1 つ欠失したアミノ酸配列から  
5 なっていた。このペプチドの Ca 上昇活性は、実施例 9 に示すように 28  
アミノ酸のグレリンと同様であることから、グレリン-27 と命名した。  
ヒトの胃抽出物からも、ラットの場合と同様にヒト・グレリン-27 を単  
離し、配列番号 1 1 記載のアミノ酸配列からなることを確認した。なお、  
上記二次 CM-HPLC で 64-65 分にあるピーク画分を精製し、電子スプレー  
10 イオン化マス分析機 (ESI-MS) 分析した結果、分子量 ( $3341.4 \pm 0.9$ ) の  
ピークが観測された。この脂肪酸修飾ペプチドは 28 アミノ酸からなるこ  
とから、グレリン (28 アミノ酸) のアミノ末端から 3 番目のセリンがデ  
カン酸 (C10) で修飾されたものであることがわかった。

グレリン 27 前駆体をコードする cDNA を、実施例 5 で作成したラット  
15 胃 cDNA ライブラリーから、実施例 5 で作成した PCR 増幅 DNA 断片をプロ  
ープとした、ブランクハイブリダイゼーションでクローニングした。cDNA  
の塩基配列を決定し、グレリン-27 前駆体をコードすることを確認した。  
得られたグレリン-27 前駆体 cDNA は、配列番号 1 4 記載の塩基配列から  
なり、配列番号 1 2 記載のアミノ酸配列を有する 116 アミノ酸からなる  
20 グレリン-27 前駆体をコードしていた。また、上記と全く同様の方法でヒ  
ト・グレリン-27 前駆体 cDNA をクローニングし、配列番号 1 5 記載の塩  
基配列からなり、配列番号 1 3 記載のアミノ酸配列を有する 116 アミノ  
酸からなるヒト・グレリン-27 前駆体をコードしていることがわかった。

ブタ由来のグレリンおよびグレリン-27 の前駆体をコードする cDNA を、  
25 ブタ cDNA ライブラリーから実施例 5 に記載の方法によって、実施例 5 に  
記載の PCR 増幅 DNA 断片をプローブとしたブランクハイブリダイゼーシ

ョンでクローニングした。得られた cDNA クローンの塩基配列を決定し、  
ブタ・グレリン前駆体又はブタ・グレリン-27 前駆体をコードしているこ  
とを確認した。得られたブタ・グレリン前駆体 cDNA は、配列番号 20 記  
載の塩基配列からなり、配列番号 18 記載のアミノ酸配列を有する 118  
5 アミノ酸からなるグレリン前駆体をコードしていた。また、ブタ・グレ  
リン-27 前駆体 cDNA は、配列番号 21 記載の塩基配列からなり、配列番  
号 19 記載のアミノ酸配列を有する 117 アミノ酸からなるグレリン-27 前  
駆体をコードしていた。従って、ブタ・グレリン (28 アミノ酸) 及びブ  
タ・グレリン-27 (27 アミノ酸) は、各々、配列番号 16 および 17 記  
10 載のアミノ酸配列からなっている。

ウナギ、アフリカツメガエルまたはニジマス由来のグレリンの前駆体  
をコードする cDNA を、各種の cDNA ライブラリーから実施例 5 に記載の  
方法によって、実施例 5 に記載の PCR 増幅 DNA 断片をプローブとしたプ  
ラークハイブリダイゼーションでクローニングした。得られた cDNA クロ  
15 ンの塩基配列を決定し、グレリン前駆体をコードしていることを確認  
した。

得られたウナギ・グレリン前駆体 cDNA は、配列番号 36 記載の塩基配  
列からなり、アフリカツメガエル・グレリン前駆体 cDNA は、配列番号 3  
7 記載の塩基配列からなり、ニジマス・グレリン前駆体 cDNA は、配列番  
20 号 38 または 39 記載の塩基配列からなっていた。

なお、ニジマスからは、配列番号 38 に記載したグレリン-23 前駆  
体をコードする cDNA と、配列番号 39 に記載したグレリン-20 前駆体  
をコードする cDNA とが得られた。

上記 cDNA の塩基配列から、ウナギ・グレリン前駆体は、配列番号 32  
25 記載のアミノ酸配列を有し、アフリカツメガエル・グレリン前駆体は配  
列番号 33 記載のアミノ酸配列を有し、ニジマス・グレリン前駆体は配

列番号 3 4 または 3 5 記載のアミノ酸配列を有することがわかった。

なお、ニジマスからは、配列番号 3 4 に記載したグレリン-23 前駆体のアミノ酸配列と、配列番号 3 5 に記載したグレリン-20 前駆体のアミノ酸配列とがわかった。

- 5      ウシ・グレリン前駆体 cDNA は PCR 法によってクローニングした。すなわち、ラット、ヒトおよびブタ由来のグレリン及びグレリン-27 で保存されているアミノ酸配列を基に設計した塩基配列を有する合成 DNA をプライマーとして、ウシ胃 cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行った。増幅された DNA 断片は配列番号 2 4 記載の塩基配列を有しており、配列番号 2 3 記載のウシ・グレリン-27 前駆体の一部をコードしていた。従って
- 10      ウシ・グレリン-27 は配列番号 2 2 記載のアミノ酸配列を有している。また、ウシ胃 cDNA ライブラリーを鋳型とする上記 PCR で増幅された DNA 断片中には、グレリン (28 アミノ酸) 前駆体をコードする DNA はなかった。

- 15      ラット、ヒトおよびブタ由来のグレリン、及びラット、ヒト、ブタおよびウシ由来のグレリン-27 のアミノ酸は、非常によく似ており、特にアミノ末端から 10 番目までのアミノ酸配列は、上記 7 種のグレリンで完全に一致していた。

#### 実施例 9. 各種グレリン誘導体の活性比較

- 20      ラットおよびヒト由来のグレリンを各種プロテアーゼによる部分分解したペプチド断片、又は化学合成したペプチドの Ca 上昇活性を比較することにより、Ca 上昇活性に必要なコア・アミノ酸配列および修飾脂肪酸の鎖長の最適値を求めた。Ca 上昇活性は最大値の 50 % の活性を示すグレリンの濃度 (EC50, nM) で表した。従って、EC50 の値が低い程、活性
- 25      が高いことになる。

#### 第 3 表

## 各種グレリン誘導体の活性比較

起源	配列番号	アミノ酸	脂肪酸修飾	Ca 上昇活性 (EC50, nM)	備考
ヒト	3	1-28	Acyl (C : 8)	2.6	天然型グレリン
ヒト	3	1-15	Acyl (C : 8)	7.0	
ヒト	3	1-11	Acyl (C : 8)	15	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 8)	2.9	天然型グレリン
ラット	2	1-15	Acyl (C : 8)	8.6	
ラット	2	1-11	Acyl (C : 8)	15	
ラット	2	1-10	Acyl (C : 8)	19	
ラット	2	1-9	Acyl (C : 8)	38	
ラット	2	1-8	Acyl (C : 8)	100	
ラット	2	1-4	Acyl (C : 8)	480	
ラット	2	16-28	Acyl (C : 8)	>10000	
ラット	2	(1-12)+ (14-28)	Acyl (C : 8)	2.8	グレリン-27
ラット	2	1-28	Acyl (C : 16)	3.1	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 10)	2.6	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 6)	16	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 4)	280	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 2)	780	

グレリンの Ca 上昇活性は、アミノ末端側に存在する。アミノ末端から 4 番目のアミノ酸までのペプチドで十分な Ca 上昇活性はあるが、アミノ末端から 10 番目のアミノ酸までのペプチドであれば、天然型グレリン

5 に近い、強い Ca 上昇活性がある。また修飾脂肪酸の鎖長について、C : 2 (アセチル基) であっても十分活性はあるが、C : 8 (オクタノイル基) で Ca 上昇活性が最高になり、その後脂肪酸の炭素数が C : 10 (デカノイル基)、C : 16 と増加しても強い Ca 上昇活性は変化しない。すなわち、アミノ末端から 3 番目のセリンを修飾している脂肪酸は、炭素数 8 以上で

10 あれば Ca 上昇活性が最も強くなる。



## 実施例 10. 各種グレリン誘導体化合物の合成

### (1) ペプチド誘導体合成

- Fmoc-D-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) および Fmoc-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) 以外のアミノ酸誘導体と合成
- 5 試薬をパーキンエルマー社、ノババイオケム社あるいは渡辺化学株式会社より購入した。ペプチド鎖の延長は主にパーキンエルマー社製アプライドバイオシステム 433A 合成機を使用し、Boc 法、あるいは Fmoc 法にて保護ペプチド誘導体-樹脂を構築した。Boc 法にて得られた保護ペプチド樹脂は、p-クレゾール存在下、無水弗化水素 (HF) で脱保護してペプチド
- 10 ドを遊離させ、精製に供した。Fmoc 法で得られた保護ペプチド樹脂はトリフルオロ酢酸 (TFA)、あるいは種々のスカベンジャーを含む希釈 TFA で脱保護し、遊離したペプチドを精製に供した。精製は、C4 あるいは C18 を用いた逆相 HPLC にて実施した。精製品は、逆相 HPLC にてその純度を確認し、アミノ酸組成分析および質量分析にて構造を確認した。
- 15 本発明品のペプチドは通常のペプチド合成法によって製造される。例えば、「生化学実験講座 1 タンパク質の化学」第 4 巻の第 2 章、第 3 章 (東京化学同人)、あるいは「続医薬品の開発 1 4 ペプチド合成」 (廣川書店) 等の成書に記載されている方法によって製造が可能である。従って、本発明品のペプチドの代表的な合成例を以下に示した。具体的には、アシル化ペプチドの合成例とアルキル化ペプチドの合成例を示した。また、
- 20 ヒト由来のグレリン (以下、hGhrelin と略すこともある) あるいはラット由来のグレリン (以下、rGhrelin と略すこともある) をトリプシン、あるいはキモトリプシン、あるいは両酵素を順番に作用させて、以下のグレリン断片 (19. Ghrelin(16-28)、20. hGhrelin(1-15)、21. rGhrelin(1-15)、23. hGhrelin(1-11)、24. rGhrelin(1-11)、25. Ghrelin(1-10)、26. Ghrelin(1-9)、27. Ghrelin(1-8)、30. Ghrelin(1-4))

を調製し、分析用 HPLC で単離したものを活性測定に供した。41. [N-Acety]-Ghrelin(1-10)は、常法に従い Ghrelin(1-10)を *N*-アセチルサクシンイミド処理して調製した。化合物番号 2. rat Ghrelin は天然物を使用、10. [Ser<sup>3</sup>(Butyryl)]-rGhrelin、11. [Ser<sup>3</sup>(Hexanoyl)]-rGhrelin、  
 5 12. [Ser<sup>3</sup>(Decanoyl)]-rGhrelin、13. [Ser<sup>3</sup>(Lauroyl)]-rGhrelin、  
 14. [Ser<sup>3</sup>(Palmitoyl)]-rGhrelin は、化合物 1 hGhrelin の合成に用いたのと同様の方法で合成し、活性測定に供した。

〔主な略号〕

- HMP 樹脂 ; 4-hydroxymethyl-phenoxyethyl 樹脂
- 10 Fmoc アミド樹脂 ; 4-(2', 4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl) phenoxyacetamido-ethyl 樹脂
- PAM 樹脂 ; phenylacetoamidomethyl 樹脂
- HBTU ; 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium Hexafluorophosphate
- 15 TBTU ; 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium tetrafluoroborate
- HOBt ; 1-hydroxybenzotriazole
- DCC ; dicyclohexylcarbodiimide
- DIPCI ; diisopropylcarbodiimide
- 20 TFA ; trifluoroacetic acid
- DIPEA ; diisopropylethylamine
- TIPS ; triisopropylsilane
- Fmoc ; fluorenylmethoxycarbonyl
- Boc ; *t*-butoxycarbonyl
- 25 Trt ; trityl
- Bu<sup>t</sup> ; *t*-butyl

- Pmc ; 2, 2, 5, 7, 8-pentamethylchroman-6-sulfonyl  
 Prl ; propionyl  
 PhPrl ; phenylpropionyl  
 Bzl ; benzyl
- 5 Bom ; benzyloxymethyl  
 Tos ; toluenesulfonyl  
 Cl-Z ; 2-chloro-benzyloxycarbonyl  
 Pis ; 2-phenylisopropyl  
 Mtt ; 4-methyltrityl
- 10 DMF ; *N,N*-dimethylformamide  
 NMP ; *N*-methylpyrrolidone  
 DMAP ; 4-dimethylaminopyridine  
 HOSu ; *N*-hydroxysuccinimide  
 Adod ; 2-aminododecanoic acid
- 15 Aib ; 2-aminoisobutylic acid  
 Ape ; 5-aminopentanoic acid  
 Cha ; cyclohexylalanine  
 Dap ; 2, 3-diaminopropionic acid  
 Nal ; naphthylalanine
- 20 Nle ; norleucine

〔合成に使用した保護アミノ酸〕

Fmoc 法 :

- Boc-Gly, Fmoc-Gly, Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Glu(OBu<sup>t</sup>),  
 Fmoc-His(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-Lys(Boc),  
 25 Fmoc-Pro, Fmoc-Leu, Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-Phe, Fmoc-<sup>D</sup>Phe,  
 Fmoc-Ser(*n*-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), Fmoc-<sup>D</sup>Ser(*n*-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), Fmoc-Cys(*n*-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) ,

Fmoc-Asp(OPis), Fmoc-Ser(Bzl), Fmoc-Cys(Trt), Fmoc-Dap(Octanoyl),  
Fmoc-2-<sup>L</sup>Nal, Fmoc-2-<sup>D</sup>Nal, Fmoc-Nle, Fmoc-Lys(Mtt), Fmoc-Aib-OH,  
Fmoc-Asp(O-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)

Boc 法 :

- 5 Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ser(Ac), Boc-Ser(Prl), Boc-Glu(OBzl),  
Boc-His(Bom), Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Pro,  
Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Val, Boc-Phe, Boc-Cys(n-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), Boc-Ape  
Boc-Ser(n-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)

〔使用した機器〕

10 (a) 分析用 H P L C システム

機器 ; 島津 LC-10A システム

カラム ; YMC PROTEIN-RP ( 4.6 mmφ x 150 mm)

カラム温度 ; 40℃

- 溶出液 ; 0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル濃度を20分間で0%  
15 から50%に直線的に変化させた。

流速 ; 1 mL/分

検出 ; UV(210 nm)

注入量 ; 10~100 μl

(b) 分取用 H P L C システム

- 20 機器 ; Waters 600 Multisolvant Delivery System

カラム ; YMC-Pack-ODS-A (5 μm, 20 mm x 250 mm)

YMC-Pack-PROTEIN-RP (5 μm, C4, 10 mm x 250mm)

YMC-Pack PROTEIN-RP (5 μm, C4, 20 mm x 250mm)

YMC PROTEIN-RP ( 4.6 mmφ x 150 mm)

- 25 溶出液 ; 0.1%トリフルオロ酢酸中、適宜アセトニトリル濃度を直線的に  
変化させた。

流速；10 mL/分（内径 20 mm カラム用）、3 mL/分（内径 10 mm カラム用）、  
1 mL/分（内径 4.6 mm カラム用）

検出；210 nm, 260 nm

注入；10~2000  $\mu$ l、2000  $\mu$ L 以上はポンプにより注入した。

5 （c）質量分析機

機器；フィニガン MAT TSQ700

イオン源；ESI

検出イオンモード；positive

スプレー電圧；4.5kV

10 キャピラリー温度；250℃

移動相；0.2%酢酸・メタノール混液（1：1）

流速；0.2 mL/分

スキャン範囲；m/z 300~1,500

（d）アミノ酸配列分析

15 機器；パーキンエルマー社製 アプライドバイオシステム 477A、492  
型シーケンサー

（e）アミノ酸組成分析

機器；日立製作所製 L-8500 型アミノ酸分析機計

試料；とくに記載のないものは、封管中、6M 塩酸で 110℃、24 時間加水

20 分解した。

（2）アシルセリンまたはアシルトレオニンを有する誘導体の合成例  
（Fmoc 法、カルボキシル末端カルボン酸）

化合物 1 hGhrelin：GSS(CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

25 Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂（ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol）を 20%ピペラ  
ジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入  
とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返す、

Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-樹脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 (1.3 g) を 1%TFA-5%TIPS-塩化メチレン溶液 (15 mL) で 30 分間処理した。ペプチド樹脂をろ取し、塩化メチレン (30 mL) で数回洗浄した後、5% DIEA (10mL)、ついで塩化メチレン (30mL) で洗浄した。得られた脱 Trt ペプチド樹脂 (約 1.3 g) を NMP (10 mL) に膨潤させ、DMAP (61.1 mg, 0.5 mmol) 存在下、オクタン酸 (144.2 mg, 1.0 mmol)、DIPCI (126.2 mg, 1.0 mmol) を加え 8 時間反応させた。樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3 位セリン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約 1.2 g を得た。このものに、88% TFA-5%フェノール-2% TIPS-5% H<sub>2</sub>O からなる脱保護試薬 (10 mL) を加え、室温で 2 時間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド約 550 mg を得た。本品 200 mg を水 10 mL に溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、120 mg の目的物を得た。

(3) アシルセリンまたはアシルトレオニンを有する誘導体の合成例 (Fmoc 法、カルボキシル末端アミド体)

化合物 3 Ghrelin(1-9)-NH<sub>2</sub>; GSS(CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)FLSPEH-NH<sub>2</sub>

Fmoc-アミド樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20% ピペラジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Pro-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His(Boc)-樹

脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 (約 550 mg) を 1%TFA-5%TIPS-塩化メチレン溶液 (10 mL) で 30 分間処理した。ペプチド樹脂をろ取し、塩化メチレン (30mL) で数回洗浄した後、5% DIEA (10mL)、ついで塩化メチレン (30mL) で洗浄した。得られた脱 Trt ペプチド樹脂 (約 750 mg) を NMP (10 mL) に膨潤させ、DMAP (61.1 mg, 0.5 mmol) 存在下、オクタン酸 (144.2 mg, 1.0 mmol)、DIPCI (126.2 mg, 1 mmol) を加え 4 時間反応させた。樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3 位セリン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約 800 mg を得た。このものに、TFA (10 mL) を加え、室温で 30 分間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド 250 mg を得た。本品約 200 mg を 30%酢酸水 10 mL に溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0%から 54%までの 60 分間直線グラジエント (流速:10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、150 mg の目的物を得た。

(4) アシルセリンまたはアシルトレオニンを有する誘導体の合成例 (Boc 法)

化合物 9 [Ser<sup>3</sup>(Propionyl)]-rGhrelin(1-28);

GSS(CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR

Boc-Arg(Tos)-Pamレジン (0.75 g, 0.5 mmol) より、保護ラットグレリン樹脂 (4-28) を Boc Chemistry で構築後、その半量 1.4 g に、Boc-Ser(CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Gly-OH を縮合した。得られた樹脂 1.5 g を HF: p-クレゾール (8.5 mL : 1.5 mL) で 0 °C、一時間処理後、HF を減圧下留去した。残さにエーテルを加え 671 mg の粗ペプチドを得た。このものを 50%酢酸 (AcOH) に溶かし、分取用カラム YMC-Pack-ODS-A (5 μm, 20 mm x 250 mm) に添加し、10 mL/min で 0.1% TFA

を含む溶液でアセトニトリル濃度を75分間で0から95%まで変化させて溶出した。目的物を含む画分を凍結乾燥して粗ペプチドを135.8 mg 得た。この一部0.5 mgをYMC-A-302カラム (C18, 4.6 mm x 150 mm) に添加し、流速1 mL/minでアセトニトリル濃度を15%から19%まで変化  
5 させて溶出した。この精製操作を繰り返し、目的とする画分を合わせ目的物0.41 mgを得た。

以下のアシルセリンまたはアシルトレオニンを有するペプチド誘導体は、上記化合物3または化合物9の製造方法と同様にして製造した。

以下にアシルセリンまたはアシルトレオニンを有するペプチド誘導体  
10 の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物1. hGhrelin

ESI-MS 3371.0 (理論値 3370.9), アミノ酸組成比: Ser; 3.53 (4), Glx; 5.91 (6), Gly; 1.02 (1), Ala; 1.00 (1), Val; 0.96 (1), Leu; 2, Phe; 1.06 (1), Lys; 3.90 (4), His; 0.97 (1), Arg; 2.87 (3), Pro; 3.87 (4)

15 化合物3. Ghrelin(1-9)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 1085.7 (理論値 1085.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.45 (3), Glx; 0.98 (1), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 0.99 (1), His; 1.08 (1), Pro; 0.97 (1)

化合物4. [Ser<sup>2</sup>(Octanoyl), Ser<sup>3</sup>]-Ghrelin(1-9)-amide

20 ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 1085.8 (理論値 1085.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.46 (3), Glx; 0.98 (1), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), His; 1.09 (1), Pro; 0.97 (1)

化合物5. [Ser<sup>2</sup>(Octanoyl)]-Ghrelin(1-9)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 1211.7 (理論値 1211.4), アミノ酸組成比: Ser; 2.48 (3),  
25 Glx; 1.00 (1), Gly; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), His; 1.11 (1), Pro; 0.98 (1)

化合物8. [Ser<sup>3</sup>(Acetyl)]-rGhrelin

ESI-MS 3231.0 (理論値 3230.7), アミノ酸組成比: Ser; 3.50 (4), Glx;



5. 90 (6), Gly ; 0. 98 (1), Ala; 2. 00 (2), Leu; 2, Phe; 1. 01 (1), Lys;  
4. 97 (5), His; 0. 99 (1), Arg; 1. 99 (2), Pro; 3. 99 (4)

化合物 9. [Ser<sup>3</sup> (Propionyl) ]-rGhrelin

ESI-MS 3245. 0 (理論値 3242. 8), アミノ酸組成比: Ser; 3. 42 (4), Glx;  
5 5. 93 (6), Gly ; 1. 00 (1), Ala; 2. 00 (2), Leu; 2, Phe; 1. 10 (1), Lys;  
4. 97 (5), His; 0. 99 (1), Arg; 1. 99 (2), Pro; 3. 83 (4)

化合物 15. [Ser<sup>3</sup> (3-Phenylpropionyl) ]-hGhrelin

ESI-MS 3377. 0 (理論値 3376. 9), アミノ酸組成比: Ser; 3. 06 (4),  
Glx; 5. 92 (6), Gly ; 0. 93 (1), Ala; 0. 98 (1), Val; 0. 99 (1), Leu;  
10 2, Phe; 1. 13 (1), Lys; 4. 03 (4), His; 1. 08 (1), Arg; 3. 00 (3), Pro;  
3. 76 (4)

化合物 16. [Ser<sup>3</sup> (3-Octenoyl) ]-hGhrelin

ESI-MS 3369. 0 (理論値 3368. 9), アミノ酸組成比: Ser; 3. 59 (4), Glx;  
5. 91 (6), Gly ; 1. 00 (1), Ala; 1. 02 (1), Val; 0. 99 (1), Leu; 2, Phe;  
15 1. 15 (1), Lys; 3. 97 (4), His; 0. 98 (1), Arg; 2. 93 (3), Pro; 3. 88 (4)

化合物 28. Ghrelin(1-8)-amide

ESI-MS [M+H] 948. 5 (理論値 948. 1), アミノ酸組成比: Ser; 2. 45 (3),  
Glx; 0. 97 (1), Gly ; 0. 99 (1), Leu; 1, Phe; 1. 00 (1), Pro; 0. 97 (1)

化合物 29. Ghrelin(1-7)-amide

20 ESI-MS [M+H] 819. 6 (理論値 819. 0), アミノ酸組成比: Ser; 2. 52 (3),  
Gly ; 1. 01 (1), Leu; 1, Phe; 1. 02 (1), Pro; 1. 09 (1)

化合物 30. Ghrelin(1-6)-amide

ESI-MS [M+H]; 722. 4 (理論値 721. 8), アミノ酸組成比: Ser; 2. 47 (3),  
Gly ; 0. 99 (1), Leu; 1, Phe; 1. 00 (1)

25 化合物 31. Ghrelin(1-5)

ESI-MS [M+H] 636. 5 (理論値 635. 8), アミノ酸組成比: Ser; 1. 78 (2),  
Gly ; 0. 99 (1), Leu; 1, Phe; 1. 02 (1)

化合物 32. Ghrelin(1-5)-amide

- ESI-MS [M+H] 635.4 (理論値 634.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.67 (2),  
Gly; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1),  
化合物 33-2. Ghrelin(1-4)-amide  
ESI-MS [M+H] 522.2 (理論値 521.6), アミノ酸組成比: Ser; 1.65 (2),  
5 Gly; 0.99 (1), Phe; 1  
化合物 34. Ghrelin(1-3)-amide  
ESI-MS [M+H] 375.2 (理論値 374.4), アミノ酸組成比: Ser; 1.66 (2),  
Gly; 1  
化合物 35. [Lys<sup>8</sup>]-Ghrelin(1-8)-amide  
10 ESI-MS [M+H] 947.9 (理論値 947.1), アミノ酸組成比: Ser; 2.70 (3),  
Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00(1), Lys; 0.99 (1), Pro; 1.00 (1)  
化合物 36. [Arg<sup>8</sup>]-Ghrelin(1-8)-amide  
ESI-MS [M+H] 975.8 (理論値 975.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.70 (3),  
Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Arg; 0.99 (1), Pro; 1.00 (1)  
15 化合物 37. [Lys<sup>6</sup>]-Ghrelin(1-6)-amide  
ESI-MS [M+H] 763.6 (理論値 762.9), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2),  
Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Lys; 1.00 (1)  
化合物 38. [Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide  
ESI-MS [M+H] 650.5 (理論値 649.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.79 (2),  
20 Gly; 0.99 (1), Phe; 1, Lys; 0.99 (1)  
化合物 39. [<sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide  
ESI-MS [M+H] 650.5 (理論値 649.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.79 (2),  
Gly; 0.99 (1), Phe; 1, Lys; 0.99 (1)  
化合物 40. [*N*-Aminopentanoyl]-Ghrelin(3-7)-amide  
25 ESI-MS [M+H] 774.7 (理論値 774.0), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2),  
Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Pro; 1.00 (1)  
化合物 43. [*N*-Glycyl]-Ghrelin(3-7)-amide  
ESI-MS [M+H]; 732.7 (理論値 731.9), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2),  
Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Pro; 1.00 (1)  
30 化合物 44. [Leu<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide  
ESI-MS [M+H]; 845.7 (理論値 845.1), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2),

Gly ; 1.01 (1), Leu; 2, Phe; 1.02 (1), Pro; 0.99 (1)

化合物 45. [His<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 869.7 (理論値 869.0), プロピオン酸・塩酸(50/50)で  
150℃, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.02 (2), Gly ; 1.00

5 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), His; 0.95 (1), Pro; 0.99 (1)

化合物 46. [Lys<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 860.7 (理論値 860.1), プロピオン酸・塩酸(50/50)で  
150℃, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.04 (2), Gly ; 1.00

(1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)

10 化合物 47. [Gly<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 789.5 (理論値 788.9), プロピオン酸・塩酸(50/50)で  
150℃, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.14 (2), Gly ; 2.01

(2), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)

化合物 59. [Thr<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin

15 ESI-MS M; 3384.0 (理論値 3384.9) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.02  
(1) , Arg ; 2.99 (3) , Glx ; 5.91 (6) , Gly ; 1.02 (1) , His ; 1.00  
(1) , Leu ; 2 (2) , Lys ; 4.05 (4) , Phe ; 1.00 (1) , Pro ; 4.06  
(4) , Ser ; 2.66 (3) , Thr;0.94 (1) , Val ; 0.96 (1)

化合物 60. [Leu<sup>2</sup>, Thr<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin

20 ESI-MS M; 3410.0 (理論値 3411.0) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.01  
(1) , Arg ; 2.95 (3) , Glx ; 5.92 (6) , Gly ; 1.01 (1) , His ; 1.01  
(1) , Leu ; 3 (3) , Lys ; 4.02 (4) , Phe ; 1.01 (1) , Pro ; 4.00  
(4) , Ser ; 1.81 (2) , Thr;0.96 (1) , Val ; 0.97 (1)

化合物 69. [Ser<sup>3</sup>(4-Methylpentanoyl)]-hGhrelin

25 ESI-MS M; 3343.0 (理論値 3342.9) アミノ酸組成比: Ala ; 1.00 (1) ,  
Arg ; 2.97 (3) , Glx ; 5.86 (6) , Gly ; 1.02 (1) , His ; 1.01 (1) , Leu ;  
2 , Lys ; 4.00 (4) , Phe ; 1.01 (1) , Pro ; 3.99 (4) , Ser ; 3.54  
(4) , Val ; 0.98 (1)

化合物 75. [Lys<sup>7</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 850.5 (理論値 850.0), アミノ酸組成比: Ser; 2.67 (3), Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 1.00 (1)

(5) アミノ末端アシル化誘導体の合成例

5 化合物 6. [*N*-Octanoyl, Ser<sup>3</sup>]-Ghrelin(1-9)-amide;

C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>CO-GSSFLSPEH-NH<sub>2</sub>

- Fmoc-アミド樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20%ピペラジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、
- 10 Fmoc-Gly-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His(Boc)-樹脂を構築した。ピペラジン処理後、得られたペプチド樹脂 (550 mg) を NMP で洗浄し、HOBt (135.1 mg, 1 mmol) 存在下、DIPCI (126.2 mg, 1 mmol) とオクタン酸 (144.2 mg, 1.0 mmol) を加え 4 時間反応させた。樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、アミノ末端 Gly
- 15 アミノ基がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約 600 mg を得た。TFA (10 mL) で脱保護し (30 分間処理)、粗ペプチド 200 mg を得た。全量を YMC-Pack PROTEIN-RP (5 μm, C<sub>4</sub>, 20 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。約 180 mg の目的物を得た。
- 20 測定値 ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 1085.6 (理論値 1085.2)、アミノ酸組成比: Ser; 2.47 (3), Glx; 0.98 (1), Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1), His; 1.09 (1), Pro; 0.96 (1)

(6) 側鎖アルキルセリンを含む誘導体の合成例

化合物 50. [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide; GSS(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)FLSP-NH<sub>2</sub>

25 Fmoc-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)

氷冷下、Boc-Ser (12.3 g, 53.9 mmol) の DMF (300 ml) 溶液に水素化ナ

トリウム (3.19g, 133 mmol) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。この中に、  
ヨウ化オクタン (11.0 ml, 60.9 mmol) を加え、室温で 16 時間攪拌した。  
氷冷下、反応液に水 (40 ml) を滴下した後、溶媒を減圧留去した。得られ  
た残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ゲル; Merck 社製  
5 Art9385、溶出溶媒; ジクロロメタン: メタノール: 酢酸 = 120:10:1)  
に付して精製し、Boc-Ser ( $C_8H_{17}$ ) を淡黄色油状物として 6.88 g (収率  
36.2 %) 得た。この Boc-Ser ( $C_8H_{17}$ ) (6.88 g, 21.7 mmol) に氷冷下、トリ  
フルオロ酢酸 (120 ml) を加え、室温で 0.5 時間攪拌した。トリフルオロ  
酢酸を減圧留去した後、得られた残渣をジエチルエーテル (120 ml) に溶  
10 解し、4N 塩酸-ジオキサン (22 ml) を加え、氷冷下、1 時間攪拌した。析  
出した結晶をろ取し、H-Ser ( $C_8H_{17}$ ) · HCl を無色結晶として 5.23 g (収率  
96.3 %) 得た。この H-Ser ( $C_8H_{17}$ ) · HCl (2.54 g, 10.0 mmol) の 10 % 炭酸  
水素ナトリウム (50 ml) 懸濁液にトリエチルアミン (1.40 ml, 10 mmol)  
を加えた後、この中に Fmoc-OSu (5.00 g, 14.8 mmol) の 1,2-ジメトキシ  
15 エタン (20 ml) 溶液を 10 分間かけて滴下し、室温で 16 時間攪拌した。  
不溶物をろ過し、ろ液にジクロロメタンを加え有機層を分離した後、13 %  
食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去  
した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ゲル; 富  
士シリシア社製 BW-300、溶出溶媒; ジクロロメタン: メタノール = 93:  
20 7) に付して精製し、Fmoc-Ser ( $C_8H_{17}$ ) を無色結晶として 2.75 g (収率  
62.6 %) 得た。Rf=0.45 ( $CHCl_3$ :MeOH=9:1, Silica gel 60F<sub>254</sub>, MERCK)  
Fmoc-D-Ser ( $C_8H_{17}$ ): Rf=0.45 ( $CHCl_3$ :MeOH=9:1, Silica gel 60F<sub>254</sub>, MERCK)  
Fmoc-アミド樹脂 (ABI 社製、400 mg, 0.25 mmol) を 20% ピペラジンで  
20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジ  
ンによる脱 Fmoc を繰り返して、  
Fmoc-Ser (Bu<sup>t</sup>)-Ser ( $C_8H_{17}$ )-Phe-Leu-Ser (Bu<sup>t</sup>)-Pro 樹脂を構築した。最後

に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 から 250 mg をとり TFA (10 mL) で 30 分間処理した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とし粗ペプチド約 120 mg を得た。本品を 5% AcOH (10 mL) に溶かし、YMC-Pack-ODS-A (5  $\mu$ m, 20 mm x 250  
5 mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 60% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、40 mg の目的物を得た。

化合物 84. [*N*-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(3-5)-benzyl amide ;

10 H-Ape-Ser (C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)-Phe-Leu-NH-CH<sub>2</sub>-Ph

オキシム樹脂 (230 mg/0.25 mmol, Novabiochem 製) をグラスフィルター付反応容器に入れ、予め塩化メチレン (DCM) に溶かし、MgSO<sub>4</sub> で乾燥した Boc-Leu-OH · H<sub>2</sub>O (190 mg, 0.75 mmol)、DCC (160 mg, 0.75 mmol)、および DCM 5mL を加え、終夜振盪した。適量の DCM、DCM / EtOH=1:1、  
15 DCM で順次数回ずつ洗浄した。Leu 導入後は、① 25% TFA / DCM 10mL を加え 30 分振盪した後、DCM、イソプロピルアルコール (iPrOH)、DCM、DMF でそれぞれ数回洗浄する、② 三角フラスコ中で Boc アミノ酸 0.75 mmol (3 当量)、TBTU 0.75 mmol (3 当量)、HOBt 0.75 mmol (3 当量) を DMF 5 mL に溶解し、DIPEA 1.25 mmol (5 当量) を加え攪拌したものを反応容  
20 器に入れ 1 時間振盪する、という操作を繰り返し、順次アミノ酸を縮合した。最終的に Boc-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO -Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)-Phe-Leu-Oxime 樹脂 370 mg を得た。DMF 約 5mL 中に懸濁させ、ベンジルアミン塩酸塩 (180 mg, 1.25mmol)、トリエチルアミン (173  $\mu$ L, 1.25mmol)、酢酸 72  $\mu$ L (1.25 mmol) を加え攪拌した。24 時間後、樹脂を濾去し、濾液を減圧留去し、  
25 1N HCl 10mL で Boc 保護体を析出させた。水洗、乾燥後、TFA 5mL を加え 30 分反応させ脱 Boc を行った。TFA を減圧留去し、エーテル (Et<sub>2</sub>O) で

沈殿させ、目的物 [*N*-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(3-5)-benzylamide 110 mg を得た。同様の方法で化合物 82、83、85 を合成した。

- 5      以下のアルキルセリンを有するペプチド誘導体は、化合物 82～85 を除き、上記化合物 50 の製造方法と同様にして製造した。

以下にアルキルセリンを有するペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物 17. [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-hGhrelin

- 10      ESI-MS ; 3357.0 (理論値 ; 3356.9)、アミノ酸組成比 : Ser ; 2.92 (3+1), Glx ; 5.94 (6), Gly ; 1.00 (1), Ala ; 0.98 (1), Val ; 0.99 (1), Leu ; 2, Phe ; 1.13 (1), Lys ; 4.04 (4), His ; 1.09 (1), Arg ; 3.01 (3), Pro ; 3.89 (4)

化合物 50. [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

- 15      ESI-MS [M+H] ; 805.5 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150℃、2 時間加水分解後のアミノ酸組成比 : Ser ; 0.86 (2+1), Gly ; 1.01 (1), Leu ; 1, Phe ; 1.06 (1), Pro ; 0.95 (1)

化合物 51. [Ser<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

- 20      ESI-MS [M+H] ; 805.4 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150℃、2 時間加水分解後のアミノ酸組成比 : Ser ; 0.97 (2+1), Gly ; 1.00 (1), Leu ; 1, Phe ; 1.05 (1), Pro ; 1.16 (1)

化合物 52. [<sup>D</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

- 25      ESI-MS [M+H] ; 805.4 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150℃、2 時間加水分解後のアミノ酸組成比 : Ser ; 1.51 (2+1), Gly ; 1.00 (1), Leu ; 1, Phe ; 1.00 (1), Pro ; 1.00 (1)

化合物 53. [<sup>D</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H] ; 805.5 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)

で 150℃, 2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.51 (2+1), Gly ;  
1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.01 (1)

化合物 67. [Ser<sup>3</sup>(Bzl)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3335.0 (理論値 3334.8) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.00  
5 (1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 1.01 (1),  
Leu ; 2 (2), Lys ; 4.00 (4), Phe ; 1.02 (1), Pro ; 4.08 (4), Ser ;  
3.58 (4), Val ; 0.98 (1)

化合物 76. [N-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl), Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(3-5)  
-amide

10 ESI-MS [M+H]; 591.5 (理論値 590.8), アミノ酸組成比: Ser; 0.45 (1),  
Phe; 1, Lys; 1.00 (1)

化合物 77. [N-Aminopentanoyl, <sup>D</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(3-5)  
-amide

ESI-MS [M+H]; 591.5 (理論値 590.8), アミノ酸組成比: Ser; 0.45 (1),  
15 Phe; 1, Lys; 1.01 (1)

化合物 78. [Aib<sup>1</sup>, His<sup>2</sup>, Ser<sup>3</sup>(Octyl), Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide

ESI-MS [M+H]; 714.6 (理論値 713.9), アミノ酸組成比: Ser; 0.45 (1),  
Phe; 1, His; 1.01 (1), Lys; 1.00 (1)

化合物 79. [Aib<sup>1</sup>, His<sup>2</sup>, <sup>D</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)  
20 -amide

ESI-MS [M+H]; 714.5 (理論値 713.9), アミノ酸組成比: Ser; 0.44 (1),  
Phe; 1, His; 1.00 (1), Lys; 1.01 (1)

化合物 81. [N-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(3-5)-amide

ESI-MS [M+H]; 576.5 (理論値 575.8), アミノ酸組成比: Ser; 0.49 (1),  
25 Leu; 1, Phe; 0.99 (1)

化合物 82. [N-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(3-5)



-methanamide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 590.6 (理論値 589.8), アミノ酸組成比: Ser; 0.49 (1),  
Leu; 1, Phe; 0.99 (1)

化合物 83. [*N*-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(3-5)

5 -ethanamide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 604.3 (理論値 603.8), アミノ酸組成比: Ser; 0.50 (1),  
Leu; 1, Phe; 0.99 (1)

化合物 84. [*N*-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(3-5)

-benzamide

10 ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 666.5 (理論値 665.9), アミノ酸組成比: Ser; 0.46 (1),  
Leu; 1, Phe; 0.98 (1)

化合物 85. [*N*-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(3-5)

-aminoethanamide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 619.6 (理論値 618.9), アミノ酸組成比: Ser; 0.47 (1),  
15 Leu; 1, Phe; 0.99 (1)

(7) 側鎖アルキルシステインを含む誘導体の合成例

化合物 48. [Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-NH<sub>2</sub>; GSC(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)FLSP-NH<sub>2</sub>

Fmoc-アミド樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20%ピペラジンで  
20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペ  
ラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、  
Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Cys(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)-Phe-Leu-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Pro 樹脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂  
(550 mg) を TFA (10 mL) で 30 分間処理した。樹脂をろ去し、ろ液を  
濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とし粗ペプチド 120 mg を得た。本品  
25 を 5%酢酸 (AcOH) 10 mL に溶かし、YMC-Pack-ODS-A (5 μm, 20 mm x 250  
mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 60% ま

での60分間直線グラジエント（流速:10 mL/min）で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、44 mg の目的物を得た。

化合物 68. [Cys<sup>3</sup>(Trt)]-hGhrelin;

GSC(C-Ph<sub>3</sub>)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

- 5 Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20%ピペラジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返し、Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Cys(Trt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP 樹脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 (1.4 g) を得た。このうち 400 mg に TFA(15mL)を加え、室温で 1 時間攪拌した。ろ過して樹脂を除き、ろ液を濃縮した後、エーテルを加え沈殿とした。約 90 mg を水 40 mL に
- 10 溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0%から 54%までの 60 分間直線グラジエント（流速:10 mL/min）で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、60 mg の目的物を得た。

- 20 以下のアルキルシステインを有するペプチド誘導体は、上記化合物 48 または化合物 68 の製造方法と同様にして製造した。

以下にアルキルシステインを有するペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物 18. [Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-rGhrelin

- 25 ESI-MS ; 3317.0 (理論値; 3316.9)、アミノ酸組成比: Ser; 2.69 (3), Glx; 5.90 (6), Gly ; 1.00 (1), Ala; 1.99 (2), Leu; 2, Phe; 1.02 (1),

Lys; 4.97 (5), His; 0.99 (1), Arg; 1.98 (2), Pro; 3.87 (4)

化合物 48. [Cys<sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 821.7 (理論値 821.1)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150℃、2 時間加水分解後アミノ酸組成比: Ser; 0.60 (2), Gly; 1.08 (1), Leu; 1, Phe; 1.06 (1), Pro; 0.96 (1)

化合物 49. [Cys<sup>3</sup> (Octyl), <sup>0</sup>Phe<sup>4</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 821.6 (理論値 821.1)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で 150℃、2 時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 0.58 (2), Gly; 1.02 (1), Leu; 1, Phe; 1.06 (1), Pro; 0.97 (1)

10 化合物 68. [Cys<sup>3</sup>(Trt)]-hGhrelin

ESI-MS 3503.0 (理論値 3503.1)、アミノ酸組成比: Ser; 2.42 (3), Glx; 5.77 (6), Gly; 1.00 (1), Ala; 1.01 (1), Val; 0.94 (1), Leu; 2, Phe; 0.99 (1), Lys; 3.94 (4), His; 0.99 (1), Arg; 2.92 (3), Pro; 3.81 (4)

15 (8) N-メチルアミノ酸を含むペプチド誘導体の合成例

化合物 86. [N-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl), MePhe<sup>4</sup>, MeLeu<sup>5</sup>]-Ghrelin(3-5)-amide; NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)-MePhe-MeLeu-NH<sub>2</sub>

Fmoc-アミド樹脂 (0.40 g, 0.25 mmol) をガラスフィルター付反応容器に入れ、20% ピペリジン / NMP 15mL を加え 20 分振盪し、Fmoc 基を除去した。その後、NMP 15mL、Fmoc-MeLeu-OH 1.0 mmol (4 当量)、TBTU 1.0 mmol (4 当量)、HOBt 1.0 mmol (4 当量)、DIPEA 1.0 mmol (4 当量) を加え 1 時間振盪し、Fmoc-MeLeu を縮合した。その後、20% ピペリジンによる Fmoc 基の除去と DIPEA 2.25 mmol (9 当量) 存在下、Bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate (3 当量) による Fmoc-アミノ酸 縮合 (3 当量) を繰り返し、ペプチド鎖を延長した。縮合反応の終了を、少量の樹脂を TFA で脱保護し、HPLC および質量

分析(MS)により確認した。Boc-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-Ser(*O*-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)-MePhe-MeLeu-  
樹脂を得た後、これをTFAで30分処理して切り出しおよび脱保護を行い、  
TFA を 減 圧 留 去 、 エ ー テ ル ( Et<sub>2</sub>O ) で 洗 浄 し 、  
NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)-MePhe-MeLeu-NH<sub>2</sub> 120 mg を得た。これを  
5 YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢  
酸中、アセトニトリル 0%から 54%までの 60 分間直線グラジエント(流  
速:10 mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、70 mg の  
目的物を得た。本誘導体をプロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃、2時間  
加水分解して、アミノ酸分析機上で検出されたアミノペントタン酸のピー  
10 ク面積を、アミノペントタン酸 10 nmol に対応する面積比からペプチド量  
を定量した。

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 604.5 (理論値 603.8)、プロピオン酸・塩酸(50/50)  
で150℃、2時間加水分解後の検出アミノ酸: Ser、Ape

#### (9) 混合ジスルフィド誘導体の合成

15 化合物 57. [Cys<sup>3</sup>(S-Heptyl)]-hGhrelin;

GSC(S-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

化合物 58 の化合物 3 の製造方法に従った合成で得られた保護ペプチ  
ド-HMP 樹脂 (1 g) に 88% TFA-5%フェノール-2% TIPS-5% H<sub>2</sub>O からな  
る脱保護試薬(15 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ  
20 液を濃縮後、残さにエーテルを加え、粗[Cys<sup>3</sup>]-hGhrelin 粉末を約 550 mg  
を得た。これを YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250mm)に添加し、0.1% ト  
リフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0%から 54%までの 60 分間直線グラジ  
エント(流速:10 mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥  
し、300 mg の[Cys<sup>3</sup>]-hGhrelin(1-28)を得た。そのうち 40 mg (11.4 μ  
25 mol) を水 (20 mL) に溶解し、4,4'-ジチオジピリジン (7.5 mg、34.2  
μmol) のアセトニトリル溶液 1mL を加え、1時間放置した。反応終了を

確認した後、反応液をクロロホルムで数回洗浄し、過剰の 4, 4' -ジチオ  
ジピリジンとピリドン誘導体を除いた。 [チオピリジル  
Cys<sup>3</sup>]-hGhrelin(1-28)を含む水層 (10 mL) を 5%NH<sub>3</sub>水で pH を 7.4 とし  
て、1-ペプタンチオール (4.5 mg、34.2 μmol) のアセトニトリル溶液  
5 2mL を加えた。1 時間後、反応液を YMC-Pack ODS-A (C18, 20 mm x 250 mm)  
に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの  
60 分間直線グラジエント (流速:10 mL/min) で溶出させた。目的画分を  
分取、凍結乾燥して 15 mg の目的物を得た。

化合物 57. [Cys<sup>3</sup>(S-Heptyl)]-hGhrelin

10 ESI-MS 3391.0 (理論値 3391.0), アミノ酸組成比: Ser; 2.76 (3),  
Glx; 5.81 (6), Gly; 0.99 (1), Ala; 1.01 (1), Val; 0.95 (1), Leu;  
2, Phe; 0.99 (1), Lys; 3.95 (4), His; 0.99 (1), Arg; 2.93 (3), Pro;  
3.84 (4)

(10) 3 位側鎖にアミド、逆方向のエステルを有する誘導体の合成例

15 化合物 55. [Asp<sup>3</sup>(NH-Heptyl)]-hGhrelin;

GSD(NH-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR

Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂 (ABI 社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20% ピペラ  
ジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入  
と ピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返して、  
20 Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Asp(OPis)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His(Boc)-  
Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OB  
u<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)  
-Pro-Arg(Pmc)-HMP 樹脂を構築した。最後に DCC/HOBt にて Boc-Gly を導  
入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 (1.3 g) を 4%TFA-塩化メチレ  
ン溶液 (15 mL) で 15 分間処理した。ペプチド樹脂をろ取り、塩化メチ  
25 レン (30 mL) で数回洗浄した後、4% DIEA (10mL)、ついで塩化メチレン

(30mL)で洗浄した。

得られた脱 Pis ペプチド樹脂 (約 1.3 g) を NMP (10 mL) に膨潤させ、水溶性カルボジイミド塩酸塩 (191.7 mg, 1.0 mmol)、HOBt (135.2 mg, 1.0 mmol)、n-ペプチルアミン (115.2 mg, 1.0 mmol) を加え、8 時間反応させた。

樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3 位 Asp 側鎖がヘプチルアミド化された保護ペプチド樹脂 約 1.2 g を得た。このものに、88% TFA-5%フェノール-2% TIPS-5% H<sub>2</sub>O からなる脱保護試薬 (10 mL) を加え、室温で 2 時間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド約 550 mg を得た。

本品 200 mg を水 10 mL に溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から 54% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 mL/min) で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、120 mg の目的物を得た。

化合物 61. [Lys<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin;  
GSK(CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR  
Fmoc-Arg(Pmc)-HMP-樹脂 (ABI社製、403 mg, 0.25 mmol) を 20% ピペラジンで 20 分間処理したのち、順次 HBTU/HOBt による Fmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱 Fmoc を繰り返して  
Boc-Gly-Ser(tBu)-Lys(Mtt)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His(Boc)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Val-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Pro-Pro-Ala-Lys(Boc)-Leu-Gln(Trt)-Pro-Arg(Pmc)-HMP 樹脂を構築した。約 300mg の保護ペプチド樹脂を  
1%TFA-5%TIPS-塩化メチレン溶液 (15 mL) で 60 分間処理した。

ペプチド樹脂をろ取し、塩化メチレン (30 mL) で数回洗浄した後、10%

DIEA(10mL)、ついで塩化メチレン(30mL)で洗浄した。得られた脱Mttペプチド樹脂(約 300mg)をNMP(2 mL)に膨潤させ、HOBt(34 mg, 0.25 mmol)存在下、オクタン酸(40  $\mu$ l, 0.25 mmol)、DCC(52 mg, 0.25 mmol)を加え一晩反応させた。

- 5 樹脂をろ取し、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3位リジン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約300mgを得た。このものに、88% TFA-5%フェノール-2% TIPS-5% H<sub>2</sub>Oからなる脱保護試薬(5 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド約234mgを得た。

- 10 本品を酢酸 6 mLに溶かし、YMC-Pack ODS-A (5  $\mu$ m, 20 mm x 250 mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%から60%までの60分間直線グラジエント(流速:10 mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、100 mg のパウダーを得た。この物を2 mLの50% 酢酸
- 15 の溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (5  $\mu$ m, C4, 20 mm x 250mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%から60%までの60分間直線グラジエント(流速:10 mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、52 mg のパウダーを得た。

- 20 以下の化合物は、上記化合物 55 または化合物 61 の製造方法と同様にして製造した。

その他、Fmoc 常法で合成したペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物 54. [Asp<sup>3</sup>(O-Heptyl)]-hGhrelin(1-28)

- 25 ESI-MS 3371.0 (理論値 3370.9), アミノ酸組成比: Asx; 0.99 (1), Ser; 2.70 (3), Glx; 5.87 (6), Gly; 1.01 (1), Ala; 1.01 (1), Val;

0.94 (1), Leu; 2, Phe; 1.00 (1), Lys; 4.02 (4), His; 1.00 (1), Arg;  
2.98 (3), Pro; 3.84 (4)

化合物 55. [Asp<sup>3</sup>(NH-Heptyl)]-hGhrelin(1-28)

ESI-MS 3370.0 (理論値 3369.9), アミノ酸組成比 : Asx; 0.88 (1),  
5 Ser; 2.95 (3), Glx; 5.97 (6), Gly ; 1.21 (1), Ala; 1.03 (1), Val;  
0.98 (1), Leu; 2, Phe; 1.00 (1), Lys; 3.94 (4), His; 0.92 (1), Arg;  
2.91 (3), Pro; 3.99 (4)

化合物 56. [Dap<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3370.0 (理論値 3369.9) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.02  
10 (1) , Arg ; 2.94 (3) , Glx ; 5.94 (6) , Gly ; 1.00 (1) , His ; 0.91  
(1) , Leu ; 2 (2) , Lys ; 3.93 (4) , Phe ; 0.99 (1) , Pro ; 4.01  
(4) , Ser ; 2.88 (3) , Val ; 0.98 (1) , Dap ; N. D.

化合物 58. [Adod<sup>3</sup>]-hGhrelin(1-28)

ESI-MS M; 3355.0 (理論値 3355.0) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.01  
15 (1) , Arg ; 2.91 (3) , Glx ; 5.95 (6) , Gly ; 1.01 (1) , His ; 0.91  
(1) , Leu ; 2 (2) , Lys ; 3.94 (4) , Phe ; 0.99 (1) , Pro ; 4.02  
(4) , Ser ; 2.88 (3) , Val ; 0.96 (1)

化合物 61. [Lys<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3412.0 (理論値 3412.0) アミノ酸組成比 : Ala ; 1.05  
20 (1) , Arg ; 3.05 (3) , Glx ; 6.02 (6) , Gly ; 1.00 (1) , His ; 1.00  
(1) , Leu ; 2 (2) , Lys ; 5.11 (5) , Phe ; 0.97 (1) , Pro ; 4.20  
(4) , Ser ; 2.68 (3) , Val ; 1.00 (1)

化合物 62. [Trp<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3343.0 (理論値 3343.9), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.00 (1),  
25 Arg ; 3.03 (3), Glx ; 5.94 (6), Gly ; 1.01 (1), His ; 1.01(1), Leu ;  
2 (2), Lys ; 4.00 (4), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 3.96 (4), Ser ; 2.60



(3), Trp ; N.D. , Val ; 0.98 (1)

化合物 63. [Phe<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3305.0 (理論値 3304.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 0.99 (1),  
Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.86 (6) , Gly ; 1.00 (1) , His ; 1.00 (1), Leu ;  
5 2 (2), Lys ; 3.98 (4), Phe ; 2.01 (2), Pro ; 3.99 (4), Ser ; 2.67  
(3), Val ; 0.98 (1)

化合物 64. [Cha<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3411.0 (理論値 3410.9), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.02 (1),  
Arg ; 3.01 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.01 (1), His +Cha; 2.01 (1+1),  
10 Leu ; 2 (2), Lys ; 4.02 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 4.03 (4), Ser ;  
2.72 (3), Val ; 0.97 (1)

化合物 65. [2-<sup>L</sup>Nal<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3354.0 (理論値 3354.9), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.00 (1),  
Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.87 (6), Gly ; 1.02 (1), His ; 1.01 (1), Leu ;  
15 2 (2), Lys ; 3.98 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 3.94 (4), Ser ; 2.73  
(3), Val ; 0.97 (1), Nal ; N.D. (1)

化合物 66. [2-<sup>D</sup>Nal<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3355.0 (理論値 3354.9), アミノ酸組成比 : Ala ; 1.02 (1),  
Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.96 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 0.92 (1), Leu ;  
20 2 (2), Lys ; 3.94 (4), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 4.02 (4), Ser ; 2.91  
(3), Val ; 0.98 (1), Nal ; N.D. (2)

化合物 70. [Leu<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3270.0 (理論値 3270.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 0.99 (1),  
Arg ; 2.95 (3), Glx ; 5.88 (6), Gly ; 1.01 (1), His ; 1.00 (1), Leu ;  
25 3 (3), Lys ; 3.96 (4), Phe ; 1.00 (1), Pro ; 3.89 (4), Ser ; 2.65  
(3), Val ; 0.97 (1)

化合物 71. [Ile<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3270.0 (理論値 3270.8), アミノ酸組成比: Ala ; 0.98 (1),  
Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.87 (6), Gly ; 0.99 (1), His ; 1.01 (1), Ile ;  
0.98 (1), Leu ; 2 (2), Lys ; 3.97 (4), Phe ; 1.00 (1), Pro ; 3.97  
5 (4), Ser ; 2.65 (3), Val ; 0.98 (1)

化合物 72. [Lys<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin

ESI-MS M; 3286.0 (理論値 3285.8), アミノ酸組成比: Ala ; 1.02 (1),  
Arg ; 2.94 (3), Glx ; 5.95 (6), Gly ; 0.99 (1), His ; 0.92 (1), Leu ;  
2 (2), Lys ; 4.92 (5), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 4.02 (4), Ser ; 2.91  
10 (4), Val ; 0.99 (1)

化合物 73. [Nle<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3270.0 (理論値 3270.8), アミノ酸組成比: Ala ; 1.01 (1),  
Arg ; 2.98 (3), Glx ; 5.92 (6), Gly ; 1.02 (1), His ; 1.01 (1), Leu ;  
2 (2), Lys ; 4.01 (4), Phe ; 1.01 (1), Pro ; 4.01 (4), Ser ; 2.71  
15 (3), Val ; 0.98 (1), Nle ; N.D. (1)

化合物 74. [Val<sup>3</sup>]-hGhrelin

ESI-MS M; 3256.0 (理論値 3256.8), アミノ酸組成比 : Ala ; 0.98  
(1), Arg ; 2.96 (3), Glx ; 5.84 (6), Gly ; 1.00 (1), His ; 1.01 (1),  
Leu ; 2 (2), Lys ; 3.97 (4), Phe ; 0.99 (1), Pro ; 3.94 (4), Ser ;  
20 2.64 (3), Val ; 1.97 (2)

化合物 80. [Aib<sup>1</sup>, His<sup>2</sup>, <sup>D</sup>Nal<sup>3</sup>, <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide;  
Ipamorelin

ESI-MS [M+H]; 712.5 (理論値 711.9), アミノ酸組成比: Phe; 1, His;  
1.00 (1), Lys; 1.00 (1)

25

## 実施例 11 グレリン誘導体ペプチド系化合物の活性比較

実施例 10 において合成したグレリン誘導体ペプチド系化合物および天然型グレリンペプチドについて、実施例 1 に示した方法によって Ca 上昇活性を測定した。

(1) 3 位セリン側鎖の修飾

5 ア. オクタノイル基の位置

グレリンの著しい構造上の特徴は 3 位セリン水酸基のオクタノイル基である。まず、オクタノイル化されるセリンの位置が 3 位であることが活性発現に有利であるかどうかを調べた。ラット GSH レセプターを発現させた CHO 細胞を用い、細胞内カルシウム上昇作用を指標とした。

10 その  $EC_{50}$  値が 5.4 nM に保持された短鎖グレリン誘導体であるグレリン (1-9) アミドをもとに、[セリン<sup>2</sup> (オクタノイル), セリン<sup>3</sup>]-グレリン (1-9) アミド、[セリン<sup>2</sup> (オクタノイル)]-グレリン (1-9) アミド、および[N<sup>α</sup>-オクタノイル, セリン<sup>3</sup>]-グレリン (1-9) アミドを合成し、細胞内カルシウム上昇活性を検討した。

15 結果を第 4 表にまとめた。

第 4 表

## グレリン誘導体の活性 1

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>1. human Ghrelin</b> GSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.3
<b>2. rat Ghrelin</b> GSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1.5
<b>3. Ghrelin(1-9)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH <sub>2</sub>	5.4
<b>4. [Ser<sup>2</sup> (Octanoyl), Ser<sup>3</sup>]-Ghrelin(1-9)-amide</b> H-Gly-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH <sub>2</sub>	1,100
<b>5. [Ser<sup>2</sup> (Octanoyl)]-Ghrelin(1-9)-amide</b> H-Gly-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH <sub>2</sub>	1,400
<b>6. [N-Octanoyl, Ser<sup>3</sup>]-Ghrelin(1-9)-amide</b> C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> CO-Gly-Leu-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH <sub>2</sub>	>10,000

ヒトグレリンのオクタノイル基を 3 位から 2 位セリンに移すと活性は  
5 約 1/200 に低下した (EC<sub>50</sub>=1,100 nM)。

2 位と 3 位の両方にオクタノイル基を有する誘導体も同様に活性が低下した (EC<sub>50</sub>=1,400 nM)。

また、アミノ末端アミノ基のみを N-オクタノイル化すると活性は比較的弱くなった (EC<sub>50</sub>>10,000 nM)。

10 これらの結果から、オクタノイル基で修飾されたアミノ酸の位置はグレリン分子において 3 位が特に好ましいことが判明した。

## イ. 脂肪酸鎖長

ラットグレリン 3 位セリン側鎖のオクタノイル基を除去したデス-オクタノイル体の細胞内カルシウム上昇活性はオクタノイル体の 2.6 nM  
15 から 3,500 nM に低下することから、3 位セリン側鎖のオクタノイル基は活性発現に極めて重要な役割を果たしていることは明らかである。

そこで、種々の飽和脂肪酸を用い、ラットグレリンにおけるセリン側

- 鎖アシル基の炭素数と活性の関係を調べた。即ち、アセチル基 ( $\text{CH}_3\text{CO}-$ )、  
 プロピオニル基 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}-$ )、ブチリル基 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ )、ヘキサノイ  
 ル基 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CO}-$ )、デカノイル基 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$ )、ラウロイル基 ( $\text{CH}_3$   
 ( $\text{CH}_2$ )<sub>10</sub> $\text{CO}-$ )、及びパルミトイル基 ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$ ) で 3 位セリン水酸基  
 5 をアシル化したグレリン誘導体の細胞内カルシウム上昇活性を求めた。

結果を第 5 表にまとめた。

第 5 表

グレリン誘導体の活性 2

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
7. [Ser <sup>3</sup> ]-rat Ghrelin GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	3, 500
8. [Ser <sup>3</sup> (Acetyl) ]-rGhrelin GSS(CO-CH <sub>3</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	780
9. [Ser <sup>3</sup> (Propionyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	n. t.
10. [Ser <sup>3</sup> (Butyryl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	280
11. [Ser <sup>3</sup> (Hexanoyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	16
12. [Ser <sup>3</sup> (Decanoyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1. 7
13. [Ser <sup>3</sup> (Lauroyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	2. 4
14. [Ser <sup>3</sup> (Palmitoyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	6. 5

表中、n. t. は試験を行っていないことを示す。

- 10 脂肪酸鎖長の活性への影響は、アセチル基 (C2) で EC<sub>50</sub> 値が 780 nM、  
 ブタノイル基 (C4) で EC<sub>50</sub> 値が 280 nM と次第に顕著となり、ヘキサノ  
 イル基 (C7) で EC<sub>50</sub> 値が 16 nM と Ca 上昇活性がさらに上昇し、オクタ  
 ノイル基 (グレリン) で EC<sub>50</sub> 値が 1.5 nM と Ca 上昇活性がピークに達  
 した。デカノイル基 (C10) でも EC<sub>50</sub> が 1.7 nM と Ca 上昇活性はグレリ  
 15 ンと同等に保持され、さらにラウロイル基 (C12) で EC<sub>50</sub> 値が 2.4 nM、

パルミトイル基 (C16) でも  $EC_{50}$  値が 6.5 nM と脂肪酸鎖長を延ばしても C a 上昇活性が保持された。

ウ. 種々のアシル基置換

- 飽和脂肪酸に替え、3-フェニルプロピオン酸 ( $H_3C-CH_2-CH_2-Ph$ ) を
- 5 芳香族脂肪酸の代表例として3位セリン水酸基にエステル結合させたヒトグレリン誘導体、および不飽和脂肪酸の代表例として3-オクテン酸 ( $(CH_3(CH_2)_3CH=CH-CH_2COOH$ )、分枝状脂肪酸の代表例として4-メチルペンタン酸 ( $(CH_3)_2CH-CH_2CH_2CO_2H$ ) をエステル結合させたヒトグレリン誘導体を作成し活性を評価した。

10 エ. アルキル基への置換

化学的に不安定なエステル結合をより安定なエーテル、チオエーテル結合などに変換すれば化学的に安定なグレリン誘導体の作成が可能である。しかしながら、活性が保持されることが前提であることは言うまでもない。

- 15 そこで、ヒトグレリンの3位セリンをオクチル ( $C_8H_{17}$ ) 化したヒトグレリンのエーテル誘導体、およびラットグレリンの3位セリンをシステインに置換し、同様にオクチル化したラットグレリンのチオエーテル体の活性を調べた。

- また、ヒトグレリンの3位セリンをベンジル化 ( $-CH_2Ph$ ) した誘導体、
- 20 およびヒトグレリンの3位セリンをシステインに置換しトリチル化 ( $-C(Ph)_3$ ) した誘導体を作成した。

- 結果を第6表にまとめた。なお、ヒトグレリンの3位セリンをベンジル化 ( $-CH_2Ph$ ) した誘導体、およびヒトグレリンの3位セリンをシステインに置換しトリチル化 ( $-C(Ph)_3$ ) した誘導体の C a 上昇活性については、
- 25 第13表に化合物67、68として結果を記載した。また、4-メチルペンタン酸 ( $(CH_3)_2CH-CH_2CH_2CO_2H$ ) を3位セリン水酸基にエステル結合させたヒトグレリン誘導体の C a 上昇活性についても、第13表に化合物69

として結果を記載した。

## 第 6 表

### グレリン誘導体の活性 3

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
15. [Ser <sup>3</sup> (3-Phenylpropionyl) ]-hGhrelin GSS(CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.4
16. [Ser <sup>3</sup> (3-Octenoyl) ]-hGhrelin GSS(CO-CH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> ) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.7
17. [Ser <sup>3</sup> (Octyl) ]-hGhrelin GSS(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.2
18. [Cys <sup>3</sup> (Octyl) ]-rGhrelin GSC(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> ) FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	5.4

- 5 不飽和脂肪酸である 3-オクテノイル基を 3 位のセリンの側鎖に導入しても、オクタノイル基と同等の Ca 上昇活性 (EC<sub>50</sub>=1.7nM) であった。

- 興味深いことにフェニルプロピオニル基の導入でも、EC<sub>50</sub>=1.4 nM と Ca 上昇活性が保持され、また、分枝状脂肪酸で C6 に相当する 4-メチルペンタノイル基を導入しても、EC<sub>50</sub> 値が 4.4 nM であり、Ca 上昇活性が  
10 保持された (第 13 表、化合物 69) ことより、3 位セリン側鎖のアシル基は必ずしも直鎖アルカノイル基である必要がないことが明らかになった。

- さらに、化学的安定性が期待できる 3 位セリンあるいはシステインをオクチル化したエーテルおよびチオエーテル体の EC<sub>50</sub> 値が、それぞれ 1.2  
15 nM、5.4 nM に保持されたことより、3 位アミノ酸残基側鎖は必ずしもアシル基である必要はないことが明らかになった。

- また、3 位を Ser(Bzl) [ヒトグレリンの 3 位セリンをベンジル化 (-CH<sub>2</sub>Ph) した誘導体]、あるいは Cys(Trt) [ヒトグレリンの 3 位セリンをシステインに置換しトリチル化 (-C(Ph)<sub>3</sub>) した誘導体] に置換したグ  
20 レリンも、EC<sub>50</sub> 値がそれぞれ 7.6 nM、20 nM であり、Ca 上昇活性が保

持された（第 13 表、化合物 67、68）。

## （2）活性領域の検索

カルボキシル末端部を含むグレリン（16-28）に細胞内Ca上昇  
5 活性が比較的低い（ $EC_{50} > 10,000$  nM）こと、一方で、アミノ末端部を含  
むヒトグレリン（1-15）とラットヒトグレリン（1-15）の  $EC_{50}$   
値がそれぞれ 7.0 nM、8.6 nM と細胞内Ca上昇活性が保持されたことか  
ら、グレリンの活性部位はアミノ末端部分に存在することが明らかとな  
った（第 7 表）。

第 7 表

10 グレリン誘導体の活性 4

化合物 構造	Ca 上昇活性 $EC_{50}$ (nM)
<b>19. Ghrelin(16-28)</b> H-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-pro-Ala-lysLeu-Gln-Pro-Arg -OH	$> 10,000$
<b>20. hGhrelin(1-15)</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-A rg-Val-Gln-Gln-Arg-OH	7.0
<b>21. rGhrelin(1-15)</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-L ys-Ala-Gln-Gln-Arg-OH	8.6
<b>22. [des Gln<sup>14</sup>]-rGhrerin</b> GSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQKAQ__RKESKKPPAKLQPR	1.5

また、グレリン（1-15）において、ヒト型とラット型の活性がほ  
ぼ同等であることから、11位と12位のアミノ酸残基（ヒトでは－ア  
15 ルギニル－バリル－、ラットでは－リジル－アラニル－）はこれらのア  
ミノ酸に限られない。

このようなヒトグレリン、あるいはラットグレリンで得られた構造活  
性相関の結果は、それぞれラットグレリンあるいはヒトグレリンに適用  
できる。



また、14位のグルタミンを除去した[デス-グルタミン<sup>14</sup>]-ラットグレリンに、ラットグレリンと等しいCa上昇活性 ( $EC_{50}=1.5$  nM) が認められたことより、グレリン分子の中央部のアミノ酸が欠損していてもよい。

5 (3) ペプチド鎖長とカルボキシル末端への塩基性基の導入

活性が比較的強くみられたグレリン (1-15) をもとに、適宜カルボキシル末端側アミノ酸残基を欠損させた誘導体を作成し活性を評価した。

カルボキシル末端がカルボン酸である短鎖誘導体とカルボキシル末端  
10 がアミド化された短鎖誘導体の活性を第8表に示した。

第 8 表

## グレリン誘導体の活性 5

化合物 構造	Ca 上昇活 性 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>23. hGhrelin(1-11)</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-OH	15
<b>24. rGhrelin(1-11)</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-OH	15
<b>25. Ghrelin(1-10)</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH	19
<b>26. Ghrelin(1-9)</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-OH	38
<b>27. Ghrelin(1-8)</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-OH	100
<b>28. Ghrelin(1-8)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-NH <sub>2</sub>	13
<b>29. Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	2. 6
<b>30. Ghrelin(1-6)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-Ser-NH <sub>2</sub>	4. 8
<b>31. Ghrelin(1-5)</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-OH	68
<b>32. Ghrelin(1-5)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-Leu-NH <sub>2</sub>	6. 2
<b>33-1. Ghrelin(1-4)</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-OH	480
<b>33-2. Ghrelin(1-4)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -Phe-NH <sub>2</sub>	160
<b>34. Ghrelin(1-3)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser (CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> ) -NH <sub>2</sub>	>10, 000

グレリン (1-3) アミドの Ca 上昇活性は比較的低かった (EC<sub>50</sub> >10, 000 nM)。フェニルアラニンを延ばしたグレリン (1-4) では EC<sub>50</sub> 値が 480 nM、そのカルボキシル末端アミド体が 160 nM と Ca 上昇活性

が顕著となった。

さらにロイシンアミドを付加したグレリン（１－５）アミド体の活性は、（１－４）アミド体のさらに約２６倍上昇し（ $EC_{50}=6.2$  nM）、天然品と同レベルのCa上昇活性を示した。

- 5      最も強いCa上昇活性は、グレリン（１－７）アミド体においてみられ、その $EC_{50}$ 値は2.6 nMと天然品とほぼ同等であった。

以上の結果から、グレリン活性発現のために必須な構造的要因はアミノ末端部４残基の配列に集約されるが、５位にロイシンなどの残基が付加されることで、グレリン受容体への親和性、あるいはシグナルトランスダクションが劇的に向上するため、５位にロイシンなどの残基が付加  
10      されることが好ましい。

また、上記結果から明らかなように、カルボキシル末端カルボン酸をアミド化することによりCa上昇活性が上昇する傾向がみられた。

- 例えば、グレリン（１－９）では、アミド化することで $EC_{50}$ 値が38 nM  
15      から5.4 nMとCa上昇活性が約７倍、グレリン（１－４）では $EC_{50}$ 値が480 nMから160 nMとCa上昇活性が約３倍に上昇した。また、グレリン（１－９）アミドの９位塩基性残基ヒスチジン残基を除去したグレリン（１－８）アミドでは、 $EC_{50}$ 値が5.4 nMから13 nMとなりCa上昇活性が低下し、一方で、酸性アミノ酸である８位グルタミン酸を除去した  
20      グレリン（１－７）アミドでは、逆に $EC_{50}$ 値が13 nMから2.6 nMとなりCa上昇活性が上昇した。

アミド化の効果の一つはカルボン酸の負電荷の中和であり、上記の結果は、短鎖誘導体においてカルボキシル末端アミノ酸の塩基性が活性上昇に大きく寄与することを示すものである。

- 25      この結果を踏まえ、高い活性が得られたグレリン（１－７）アミドを中心に、カルボキシル末端部に塩基性を付与した誘導体を作成し、活性

を調べた。

結果を第 9 表に示した。

第 9 表

グレリン誘導体の活性 6

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>35. [Lys<sup>8</sup>]-Ghrelin(1-8)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Lys-NH <sub>2</sub>	1.1
<b>36. [Arg<sup>8</sup>]-Ghrelin(1-8)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Arg-NH <sub>2</sub>	1.1
<b>37. [Lys<sup>6</sup>]-Ghrelin(1-6)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Lys-NH <sub>2</sub>	12
<b>38. [Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	10
<b>39. [<sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,700

5

グレリン(1-5)のカルボキシル末端部にリジンを導入した[リジン<sup>6</sup>]-グレリン(1-6)アミドの EC<sub>50</sub> 値は、4.8 nM から 12 nM となり、Ca 上昇活性は若干低下したが、グレリン(1-4)では、カルボキシル末端部にリジンを付加することで、EC<sub>50</sub> 値が 480 nM から 10 nM となり、Ca 上昇活性が約 50 倍上昇した。また、グレリン(1-7)のカルボキシル末端部にアルギニンあるいはリジンを付加したアミド誘導体の活性は、グレリン(1-7)アミド (EC<sub>50</sub>=2.6 nM) と比べ、いずれも 1.1 nM と極めて強い細胞内カルシウム上昇活性を示した。

以上、ほとんどのケースにおいて、カルボキシル末端部における酸性のマス킹および塩基性基を導入することで、活性が上昇することが明らかになった。

(4) アミノ末端グリシンと 2 位セリン残基

活性が認められたグレリン(1-7)アミド (EC<sub>50</sub>=2.6 nM) [第 8 表化合物 29]、あるいはグレリン(1-9)アミド (EC<sub>50</sub>=5.4 nM) [第 4

表 化合物 3] をもとに、アミノ末端グリシンと 2 位セリンの活性への影響を調べた。

結果を第 10 表にまとめた。

第 10 表

5

グレリン誘導体の活性 7

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>40. [N-Aminopentanoyl]-Ghrelin(3-7)-amide</b> NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	3.4
<b>41. [N-Acetyl]-Ghrelin(1-10)</b> CH <sub>3</sub> CO-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH	>10,000
<b>42. [N-Tyr]-rGhrelin</b> YGSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	120
<b>43. [N-Glycyl]-Ghrelin(3-7)-amide</b> H-Gly-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	380
<b>44. [Leu<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Leu-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	42
<b>45. [His<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-His-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	35
<b>46. [Lys<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Lys-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	24
<b>47. [Gly<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Gly-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	78

アミノ末端のアミノ基をブロックした N<sup>α</sup>-アセチル-グレリン (1-10) の活性が比較的弱くなった。(EC<sub>50</sub>>10,000 nM)。また前述したように、[N<sup>α</sup>-オクタノイル, セリン<sup>3</sup>]-グレリン (1-9) アミド(第 10 表 化合物 6) の活性も比較的弱くなったことから (EC<sub>50</sub>>10,000 nM)、アミノ末端のアミノ基がブロックされていないことが Ca 上昇活性発現において好ましい。

一方で、アミノ末端のグリシンと 2 位セリンを、2 残基長に相当する 5-アミノ-nペンタン酸 (NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-) で置換した、N<sup>α</sup>-アミノ

ペンタノイル-グレリン (3-7) アミドの C a 上昇活性はほぼ保持されたこと ( $EC_{50}=3.4$  nM)、および 2 位セリンを欠損させた [N<sup>α</sup>-グリシル]-グレリン (3-7) アミドの C a 上昇活性が低下すること ( $EC_{50}=380$  nM)、アミノ末端にチロシン残基を付与した [*N*-チロシル]-ラットグレリンの C a 上昇活性がに低下すること ( $EC_{50}=120$  nM) などから、より強い活性を得るために好ましいアミノ末端アミノ基の位置は、3 位のオクタノイルセリン残基からアミノ酸残基で 2 残基相当分、アミノ末端方向に存在することが好ましい。

また、グレリン (1-7) アミドにおいて、2 位セリンをロイシン、グリシン、ヒスチジン、リジンに置換した誘導体の  $EC_{50}$  値は、それぞれ 42 nM、78 nM、35 nM、24 nM となり、グレリン (1-7) アミドと比べ、C a 上昇活性がやや低下した。

本結果から 2 位セリン残基-NH-CH(CH<sub>2</sub>OH)-CO-がアミノペンタン酸の部分構造-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-に置き換えることができることから、少なくとも 2 位セリン残基はグレリンアミノ末端のアミノ基を 3 位オクタノイル基から一定の距離を保つスペーサー的な役割を果たしている。また、5-アミノペンタン酸の置換で活性が保持されたのは、アルキルアミン構造の導入によってアミノ末端の塩基性が上昇したからでもある。

以上まとめると、アミノ末端部のグリシン残基はそのアミノ基をもって、グレリン分子のアミノ末端に塩基性を与え、グレリンの活性を発現せしめていると考えられるため、アミノ末端部のアミノ基はブロックされていないことが好ましい。

また 2 位セリン残基はアミノ末端アミノ基を 3 位オクタノイル基から一定の距離を保つスペーサー的な役割を果たしていると考えられるため、比較的嵩の小さい側鎖を有するアミノ酸や非アミノ酸化合物で置き換えてもよい。即ち、グレリン分子においてアミノ末端アミノ基を基点にオ

クタノイル基の位置が規定されており、この位置関係がグレリン活性構造の一部を形成している。

- すなわち、2 位アミノ酸側鎖は嵩高い構造よりは、むしろセリン、アラニン、ノルバリンのように、側鎖が比較的小さく、近隣残基の自由度を束縛しないアミノ酸残基が好ましい。加えて、N<sup>α</sup>-アミノペンタノイル-グレリン (3-7) アミドの C<sub>a</sub> 上昇活性が、ほぼ保持された (EC<sub>50</sub>=3.4 nM) ことから、2 位セリンは非アミノ酸化合物に置換可能である。

(5) 3 位、および 4 位アミノ酸残基の光学活性

- 10     グレリン (1-7) アミドの構造をもとに、3 位セリンと 4 位フェニルアラニンをそれぞれ L-体から D-体に変換した誘導体を作成し、3 位と 4 位アミノ酸の光学活性の活性に及ぼす影響を検討した。具体的には、良好な活性が保持された [セリン<sup>3</sup> (オクチル)]-グレリン (1-7) アミド (EC<sub>50</sub>=5.8 nM) [第 11 表 化合物 50]、あるいは [システイン<sup>3</sup> (オクチル)]-グレリン (1-7) アミド (EC<sub>50</sub>=7.4 nM) [第 11 表 化合物 48] をもとに 3 位セリンと 4 位フェニルアラニンを、それぞれ対応する L-体、D-体に置き換えた誘導体を作成した。

結果を第 11 表にまとめた。該結果より、3 位と 4 位のアミノ酸はともに L-体であることが好ましい。

第 1 1 表

## グレリン誘導体の活性 8

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>48. [Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Ser-Cys(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	7.4
<b>49. [Cys<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Ser-Cys(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	3,000
<b>50. [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	5.8
<b>51. [Ser<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	2,200
<b>52. [<sup>D</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Ser- <sup>D</sup> Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	>10,000
<b>53. [<sup>D</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Ser- <sup>D</sup> Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	>10,000

## (6) 3 位側鎖の結合様式

- 5 3 位の側鎖鎖長がグレリン鎖長(-CH<sub>2</sub>-O-CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)と同じになるように、本来のエステル結合を、逆方向のエステル（化合物番号 54）、アミド（化合物番号 55, 56）、ジスルフィド（化合物番号 57）、メチレン（化合物番号 58）に置換した誘導体を作成した。あわせて、β 炭素上に立体障害をもつエステル誘導体（化合物番号 59, 60）、メチレンが 3 ユニット分延びた形のアミド誘導体（化合物番号 61）を作成した。結果を第 1 2 表にまとめた。
- 10



第 1 2 表

## グレリン誘導体の活性 9

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>54. [Asp<sup>3</sup>(0-Heptyl)]-hGhrelin</b> GSD(O-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	5.1
<b>55. [Asp<sup>3</sup>(NH-Heptyl)]-hGhrelin</b> GSD(NH-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	11
<b>56. [Dap<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin</b> GS-NH- <sup>L</sup> CH(CH <sub>2</sub> NHCO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2.6
<b>57. [Cys<sup>3</sup>(S-Heptyl)]-hGhrelin</b> GSC(S-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.4
<b>58. [Adod<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GS-NH-CH(n-C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> )-CO-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	0.91
<b>59. [Thr<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin</b> GST(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	10
<b>60. [Leu<sup>2</sup>, Thr<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin</b> GLT(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	46
<b>61. [Lys<sup>3</sup>(Octanoyl)]-hGhrelin</b> GSK(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	32

3 位側鎖をすべてメチレン基に置きかえた化合物 58 の活性が最も強く、EC<sub>50</sub> 値は 1 nM 以下であった。その他、結合の種類によって活性の高低は多少みられるものの、3 位アミノ酸側鎖に結合様式は活性に大きな影響を与えないことが確認された。

## (7) 3 位側鎖の疎水性

3 位の Ser(Octanoyl)基を、天然アミノ酸を中心に、疎水性アミノ酸で置換した誘導体を作成し、それらの活性を調べた。結果を第 1 3 表にまとめた。

第 1 3 表

## グレリン誘導体の活性 1 0

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>62. [Trp<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GSWFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	31
<b>63. [Phe<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GSFFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2, 000
<b>64. [Cha<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GS-Cha-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	19
<b>65. [2-<sup>L</sup>Nal<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GS- <sup>L</sup> Nal-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	8. 2
<b>66. [2-<sup>D</sup>Nal<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GS- <sup>D</sup> Nal-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	>10, 000
<b>67. [Ser<sup>3</sup> (Bzl)]-hGhrelin</b> GSS (CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	7. 6
<b>68. [Cys<sup>3</sup> (Trityl)]-hGhrelin</b> GSC (C-Ph <sub>3</sub> ) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	20
<b>69. [Ser<sup>3</sup> (4-Methylpentanoyl)]-hGhrelin</b> GSS (CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	4. 4
<b>70. [Leu<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GSLFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	4, 400
<b>71. [Ile<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GSIFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	>10, 000
<b>72. [Lys<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GSKFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	120
<b>73. [Nle<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GS-Nle-FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	2, 800
<b>74. [Val<sup>3</sup>]-hGhrelin</b> GSVFLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1, 600

3 位にトリプトファン、シクロヘキシルアラニン、ナフチルアラニン  
 5 のような芳香族性の疎水性アミノ酸を有する誘導体の EC<sub>50</sub> 値は、それぞ  
 れ 31 nM, 19 nM, 8. 2 nM であり、Ca 上昇活性は保持された。意外にも  
 フェニルアラニンを 3 位に導入すると幾分 Ca 上昇活性は低かったが、

疎水性を上昇させた Ser(Bzl), Cys(Trityl)を3位に導入しても、同様にCa上昇活性は保持されたことから、3位側鎖の疎水性は活性発現により好ましいことが確認された。

一方、3位にロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリンのような脂肪族性の疎水性アミノ酸を導入すると、芳香族性アミノ酸を導入した場合と比べ、幾分低目ではあるが、全般にCa上昇活性は保持された。ノルロイシンを3位に有する化合物73の活性が $EC_{50}=2,800\text{ nM}$ であるのに対し、ノルロイシン側鎖にアミノ基が付加した6-アミノ-ノルロイシン(リジン; 化合物72)の活性は $EC_{50}$ 値が120 nMと上昇していることは、前述したカルボキシル基末端において塩基性であることが好ましいのと同様に、3位側鎖においても塩基性の付与が好ましいことが確認された。

#### (8) 短鎖グレリン誘導体

グレリンの活性はアミノ末端部1-4で顕著に発現し、5位にロイシンを付加することで増強されること、3位アミノ酸残基は疎水性側鎖を有するものが好適であること、塩基性残基の導入が活性を上昇させること、及び1位と2位のアミノ酸残基は $\delta$ -アミノ酸などの2残基相当長の非アミノ酸化合物で置換されうることなどの結果から、第14または15表の化合物番号76から87に示すように、アミノ末端部(1-5)配列を基本にした種々の短鎖グレリン誘導体を作成してそれらの活性を調べた。結果を第14または15表にまとめた。

なお化合物80は既知である(Ipamorerin; K. Raumら、Eur. J. of Endocrinol., 139巻、552~561ページ、1998年)。

第 1 4 表

## グレリン誘導体の活性 1 1

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
<b>75. [Lys<sup>7</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide</b> H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Lys-NH <sub>2</sub>	11
<b>76. [N-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl), Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(3-5)-amide</b> NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	12
<b>77. [N-Aminopentanoyl, <sup>D</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(3-5)-amide</b> NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO- <sup>D</sup> Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1, 600
<b>78. [Aib<sup>1</sup>, His<sup>2</sup>, Ser<sup>3</sup>(Octyl), Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide</b> H-Aib-His-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	34
<b>79. [Aib<sup>1</sup>, His<sup>2</sup>, <sup>D</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide</b> H-Aib-His- <sup>D</sup> Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	38
<b>80. [Aib<sup>1</sup>, His<sup>2</sup>, <sup>D</sup>Nal<sup>3</sup>, <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide</b> H-Aib-His- <sup>D</sup> Nal- <sup>D</sup> Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	2. 5

- 既知である化合物 80 の C a 上昇活性が 2. 5 nM と高かったことから、
- 5 化合物 80 における 3 位の 2-D-ナフチルアラニンを D-オクチルセリンに置換した化合物 79 の活性を調べたところ、EC<sub>50</sub> 値は 38 nM であり、活性は保持された。1 位と 2 位のアミノ酸構造が異なるが、化合物 79 と同様に D-オクチルセリンと D-フェニルアラニンを 3 位と 4 位に有する化合物 77 の活性が 1, 600 nM に低下したことを併せて考えると、1 位と 2 位に対応するアミノ酸の配列または構造が、活性発現に重要な 3 位と 4 位のア
- 10 ミノ酸側鎖の立体配置にも影響を与えている。

即ち、1, 2 位をアミノペンタン酸に置換した場合、3 位の 2-D-ナフチルアラニンと 4 位 D-フェニルアラニンを、それぞれ対応する L-アミノ酸に置換しても活性は 34 nM に保持された（化合物 78）ことなどから、グ

レリンの1位と2位のアミノ酸配列、Gly-Serは3位と4位にL-立体配置を要求するが、他のアミノ酸配列、例えば、Aib-His等の導入により3, 4位がD-立体配置でも活性が顕著となる。または、1, 2位にアミノペンタン酸を導入することで3, 4位はL-, D-いずれの立体配置でも活性発

5 現がみられることが確認された。

## 第15表

## グレリン誘導体の活性12

化合物 構造	Ca 上昇 活性 EC <sub>50</sub> (nM)
81. [ <i>N</i> -Aminopentanoyl, Ser <sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-amide NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-NH <sub>2</sub>	11
82. [ <i>N</i> -Aminopentanoyl, Ser <sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-methanamide NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-NH-CH <sub>3</sub>	12
83. [ <i>N</i> -Aminopentanoyl, Ser <sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-ethanamide NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-NH-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	22
84. [ <i>N</i> -Aminopentanoyl, Ser <sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(3-5)-benzylamide NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-NH-CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	98
85. [ <i>N</i> -Aminopentanoyl, Ser <sup>3</sup> (Octyl)] -Ghrelin(3-5)-aminoethanamide NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	3.5
86. [ <i>N</i> -Aminopentanoyl, Ser <sup>3</sup> (Octyl), MePhe <sup>4</sup> , MeLeu <sup>5</sup> ] -Ghrelin(3-5)-amide NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-MePhe-MeLeu-NH <sub>2</sub>	82
87. [ <sup>p</sup> Leu <sup>5</sup> ]-hGhrelin GSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )F- <sup>p</sup> L-SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	220

グレリンのアミノ末端部(1-5)配列を基本にした

10 [*N*-Aminopentanoyl, Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(3-5)を用い、カルボキシル

基末端部の構造活性相関を調べた。5位ロイシンのカルボキシル基末端をアミド、メチルアミド、エチルアミド、ベンジルアミドで修飾したところ、活性は保持されたが、 $EC_{50}$ の値がそれぞれ、11 nM, 12 nM, 22 nM, 98 nM と次第に低下する傾向が見られた。一方、エチルアミドをアミノエチルアミドとすることで、 $EC_{50}$ が 3.5 nM と活性は上昇したことより、グレリン分子においてカルボキシル基末端部に塩基性を付与することが好ましいことがわかった。

これら種々のカルボキシル末端アミド誘導体は、生体内でカルボキシペプチダーゼ類による酵素分解に抵抗することからも有用な化合物である。同様に、N-メチルアミノ酸を含む化合物 86 ( $EC_{50}=86$  nM) も酵素抵抗性を有する点で有用な化合物である。

## 実施例 1 2 ラットにおけるグレリン誘導体の GH 放出活性

### (1) ラットにおける各種長鎖グレリン誘導体の GH 放出活性

ネンブタール麻酔下の IGS-SD 系ラット (約 7 週齢) に化合物 17 ; [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-hGhrelin を 18 nmol/kg、化合物 18 ; [Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-rGhrelin を 30 nmol/kg、化合物 65 ; [2-<sup>L</sup>Nal<sup>3</sup>]-hGhrelin を 100 nmol/kg、あるいは化合物 15 ; [Ser<sup>3</sup>(3-Phenylpropinyl)]-hGhrelin を 18 nmol/kg を急速静脈内投与した (各 n=3)。投与 15 分後に血漿を採取し、GH 濃度をラジオイムノアッセイ法 (Biotrak/Amersham 社) にて測定した。コントロールとして、0.2%ウシ血清アルブミン (BSA) -生理食塩液、とそれぞれ 6 nmol/kg の rGhrelin、hGhrelin、80 nmol/kg の Ipamorelin (化合物 80) を投与し、投与後 15 分の血漿中 GH 濃度を比較した (各 n=3)。

結果を第 1 3 表に示した。化合物 17 ; [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-hGhrelin、化合物 18 ; [Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-rGhrelin および化合物 15 ; [Ser<sup>3</sup>(3-PhPrI)]-hGhrelin はいずれも強い GH 放出活性を示し、

[2-<sup>1</sup>NaI<sup>3</sup>]-hGhrelin の GH 放出活性も細胞内 Ca 上昇活性と良い相関が見られた。

# 第 16 表

各種長鎖グレリン誘導体の GH 放出活性

投与化合物	EC <sub>50</sub> 値 (n M)	投与量 (nmol/kg)	投与 15 分後の血漿中 GH 濃度 (ng/mL)			
			個体 1	個体 2	個体 3	平均 ±標準偏 差
生理食塩液	—	—	32	52	59	49 ±12
hGhrelin	1.3	6	1802	1613	2203	1873 ±301
rGhrelin	1.5	6	2056	1082	1205	1448 ±530
Ipamorelin(化合物 80)	2.5	80	377	260	1184	607 ±503
[Ser <sup>3</sup> (Octyl)] -hGhrelin	1.2	18	1626	1602	1743	1657 ±75
[Cys <sup>3</sup> (Octyl)] -rGhrelin	5.4	30	2786	2342	2354	2494 ±253
[Ser <sup>3</sup> (Phenylpropionyl)] -hGhrelin	1.4	18	2119	2078	1581	1926 ±299
[2- <sup>1</sup> NaI <sup>3</sup> ]-hGhrelin	8.2	100	1637	1576	1357	1524 ±147

5

## (2) [Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-rat Ghrelin 投与による血漿中 GH 濃度推移

ネンブタール麻酔下の Wistar 系ラット雄(約 260~280 g)に、化合物 18 ;  
[Cys(Octyl)]- rat Ghrelin を 5 μg/head 静脈内投与したときの、血中  
に放出される GH を測定した。コントロールとして生理食塩水、および rat  
10 Ghrelin (5 μg/head) を投与し、本品と比較した。

第 17 ~ 19 表に示すように、[Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-rat Ghrelin の GH 分泌促進活性は、分泌された GH の Cmax が天然型ラットグレリンと同等(ともに約 1,100 ng/ml)であり、さらに分泌時間を延長させる傾向を示した。本

品の細胞内 Ca 上昇活性は  $EC_{50}$  値で 5.4 nM であった。

第 17 表

[Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-rat Ghrelin 投与による血漿中 GH 濃度推移

[Cys(C18) <sup>3</sup> ] -ラット Ghrelin 5 $\mu$ g/head		時間 (分)						
		0	5	10	15	20	30	60
血漿中 GH 濃 度 (ng/mL )	個体 1	377	338	687	927	900	469	98
	個体 2	101	294	258	300	358	245	86
	個体 3	59	476	949	1229	1417	704	133
	個体 4	33	530	959	1451	1299	800	220
	個体 5	32	613	1060	1561	1359	726	122
平均 ±標準偏差		120 ±146	450 ±133	783 ±324	1093 ±506	1067 ±445	589 ±229	132 ±53

5 第 18 表

生理食塩液投与による血漿中 GH 濃度推移

生理食塩液		時間 (分)						
		0	5	10	15	20	30	60
血漿中 GH 濃 度 (ng/mL )	個体 1	0	88	129	133	116	107	430
	個体 2	204	122	118	134	128	69	36
	個体 3	77	0	0	0	0	0	11
	個体 4	0	0	0	0	48	27	110
	個体 5	0	0	0	0	0	0	210
平均 ±標準偏差		56 ±89	42 ±58	49 ±67	53 ±73	58 ±61	41 ±47	159 ±170



第 19 表

## ラットグレリン投与による血漿中 GH 濃度推移

ラット・レリン 5 $\mu$ g/head		時間 (分)						
		0	5	10	15	20	30	60
血漿中 GH 濃 度 (ng/mL )	個体 1	143	186	425	405	215	56	3
	個体 2	10	1396	2028	1566	876	242	27
	個体 3	838	163	443	681	419	120	36
	個体 4	348	556	1387	1469	1293	663	100
	個体 5	0	875	1380	1009	1414	452	20
平均		268	635	1133	1026	843	306	37
±標準偏差		±348	±517	±690	±498	±525	±250	±37

## 実施例 13 グレリンの食欲増進作用

## 5 (1) 脳室内投与による食欲増進作用

各種濃度のラットグレリンを溶解した生理食塩水を、体重が 300 g から 325 g の雄ウィスター (Wistar) 系ラット (一群は 16 から 20 頭) に、朝 8 時 45 分に脳室内投与した。対照は、グレリンを含まない生理食塩水を脳室内投与した。投与後は自由に摂餌させ、投与後 2 時間の摂餌量を測定した。第 6 図に示すように、50 pmol の脳室内投与で摂餌量の増加が認められ、200 pmol および 500 pmol では投与量依存的に摂餌量の増加が認められたが、2 nmol の投与では摂餌量の増加は低下した。通常ラットは夜間に摂餌するから、朝は満腹で殆ど摂餌しないが (第 6 図で対照とした生理食塩水を参照)、グレリンの脳室内投与によって食餌量が増加したことは、グレリンに食欲増進作用があることを示している。

## (2) 静脈内投与による食欲増進作用

9 ヶ月齢、雌の SD (Sprague-Dawley) 系ラット (5 頭) および ウィスター系ラット (4 頭) に、ラットグレリン 50  $\mu$ g/kg を尾静脈内投与し、投与後 2 時間の摂餌量を測定した (夕方 16:00 ~ 19:00 に評価)。

第 20 表に示したように、別の日の同時刻、同一個体について調べたラ

ットグレリン非投与時の摂餌量に比べて、グレリンの静脈内投与によって、摂餌量が明らかに増加した。すなわち、グレリンの静脈内投与によっても、食欲増進作用があることが示された。

第 20 表

5

系 統	個体番号	食餌量 (g)	
		グレリン投与	グレリン非投与
S-D	1	3.2	2.2
	2	3.7	1.0
	3	3.2	0.1
	4	2.7	1.3
	5	2.6	0.8
	平均値	3.1	1.1
ウィスター	標準偏差	0.4	0.8
	6	2.3	0.2
	7	1.9	1.4
	8	1.6	0.1
	9	2.1	0.3
	平均値	2.0	0.5
	標準偏差	0.3	0.6

#### 実施例 14. グレリンによる胃機能の亢進

グレリン投与による、胃機能への効果を調べるために以下のような実験を行った。雄性の SD 系ラット（体重 200～280g、7～8 週齢）を実験  
 10 の 20 時間以上前から絶食して用いた。ラットはウレタン（1.25 g/kg）の腹腔内投与により麻酔し、加温パッドおよび加温ライトを用いて保温した。気管内カニューレを挿管し、さらに食道を絹糸にて結紮して、下記の胃酸分泌あるいは胃運動測定用の手術を施した。覚醒下の実験は、エーテル吸入による軽度麻酔下に下記の胃酸分泌あるいは胃運動測定用の  
 15 手術を施した。

ウレタン麻酔下での胃酸分泌の実験は、Ohno らの方法 [ Ohno, T., et

- al., *Jpn. J. Pharmacol.* 43, 429-439 (1987) ] に従って手術を行った。つまり、仰臥位に腹部を正中切開し、胃および十二指腸を露出させた。ポリエチレンチューブを前胃部から挿管し急性胃瘻を作製した。もう 1 本のポリエチレンチューブを十二指腸部の切開により胃内に挿入し、  
5 幽門部周囲を結紮して固定した。胃内をリザーバー内で pH 7.0 に調整し、37℃ に加温した生理食塩水で灌流した。流速は 1.0 ml/min とした。pH 固定装置 (Hiranuma, Comitite-8) と 100 mM の NaOH 液を用いて灌流液が pH7.0 になるように滴定した。基礎胃酸分泌量が安定していることを確認した後、被験薬を静脈内投与し、胃酸分泌速度を 5 分間隔で測定した。
- 10 各群 4 例の動物を用いた。

- 覚醒下の実験では、エーテル吸入による軽度麻酔下に同様の手術を施した後に、側腹部に小切開を加えて灌流用チューブを体外に導出した。露出した胃および十二指腸を腹腔内に収め、切開部を縫合し、ボールマン型のラット用固定ケージ内に動物を伏臥位に拘束し、麻酔から覚醒したことを確認して実験に供した。なお、食道を結紮したが、気管カニューレは挿入しなかった。
- 15

- ウレタン麻酔下での胃運動測定実験は、Takeuchi & Nobuhara の方法 [Takeuchi, K. and Nobuhara, Y., *Digestive Diseases and Sciences* 30, 1181-1188 (1985) ] に従って、ミニチュアバルーン法を用いた。すなわち、水を充填したバルーンと支持用カテーテルを前胃部切開にて胃の中に挿入した。胃の腺部分に横たわるように固定し、カテーテルの一端を圧トランス・デューサー (日本光電株式会社製、LPU-0.1-350-0-II) に接続した。胃運動が安定していることを確認した後、被験薬を 60 分間隔で累積的に静脈内投与した。胃運動は 20 cmH<sub>2</sub>O 以上の振幅を持つ収縮運動の胃内圧振幅と収縮反応数を 10 分間隔で測定した。各群 4 例の動物を用いた。覚醒下の実験では、エーテル吸入による軽度麻酔下に同様の
- 20
- 25

手術を施した後に切開部を縫合し、ボールマン型のラット用固定ケージ内に動物を伏臥位に拘束し、麻酔から覚醒したことを確認して実験に供した。

ラットグレリンおよびヒスタミン 2 塩酸塩は生理食塩水に溶解し、尾  
5 静脈内に 1 ml/kg の容量で投与した。グレリンの作用に迷走神経活動が関与するか否かを調べるために、グレリンの投与 30 分前に硫酸アトロピンを皮下投与するか、あるいは頸部迷走神経束を両側性に切断した。さらにグレリンの作用におけるヒスタミン  $H_2$  受容体の関与を調べるためには、グレリンの投与 30 分前にファモチジン（ガスター®、山之内製薬  
10 株式会社製）を皮下投与した。結果は平均値±標準誤差値で表した。統計学的解析は Dunnett の多重比較法を用いて行った。P 値<0.05 を統計学的有意と判定した。

第 7 A 図および第 2 1 表に示すように、ウレタン麻酔下においてラットグレリンを 0.8~20  $\mu$ g/kg の用量で静脈内投与すると、用量依存的に  
15 胃酸分泌が促進した。

麻酔下では、グレリン投与前には胃の自発運動はほとんど認められない。その状態でラットグレリンを 0.8~20  $\mu$ g/kg の用量で静脈内投与すると、第 8 A、B 図および第 2 1 表に示すように、胃運動の振幅及び頻度ともに亢進した。これらの反応はラットグレリンの投与後、速やかに  
20 認められた。20  $\mu$ g/kg の投与時は、胃酸分泌は増大し、20 分以内に最大値に達した後、投与後 90 分までには徐々に減衰した。ラットグレリンの 20  $\mu$ g/kg による胃酸分泌促進作用の最大反応の大きさは、第 7 A、B 図に示すように、ヒスタミン 3 mg/kg を静脈内投与したときに惹起される反応にほぼ匹敵するものであった。胃運動の振幅に対する亢進作用は、  
25 各用量とも 10 分以内に最大反応に達し、20  $\mu$ g/kg 投与時は 50 分後までに徐々に減衰した。

- さらに、第21表に示すように、ラットグレリンの  $20 \mu\text{g/kg}$  投与で惹起される胃酸分泌促進作用はアトロピンあるは両側頸部迷走神経切除術の前処置によってほぼ完全に抑制され、ヒスタミン  $H_2$  受容体拮抗薬であるファモチジンを  $1 \text{ mg/kg}$  皮下投与する前処置では全く影響されなかった。また、ラットグレリン投与で惹起される胃運動亢進作用もアトロピンあるは両側頸部迷走神経切除術の前処置によって完全に抑制された。このことから、グレリンの胃機能亢進作用は、ヒスタミン系機序によるものではなく、迷走神経系を活性化することによるものであることが確認された。
- 10 一方、覚醒下ラットにおいても、上記ウレタン麻酔下と同様に、ラットグレリン ( $4$  および  $20 \mu\text{g/kg}$ ) を静脈内投与すると胃酸分泌が促進した。また、覚醒下ラットでは麻酔下に比べて被験薬投与前から胃の自発運動が発生しており、その状態にラットグレリンを  $0.8 \sim 20 \mu\text{g/kg}$  の用量で静脈内投与しても、胃運動は振幅および頻度ともに亢進した。以上
- 15 の結果から、ウレタン麻酔下及び覚醒下のいずれにおいても、グレリンの静脈内投与によって胃酸分泌の促進および胃運動の亢進が起こることが確かめられた。

第 2 1 表

処置		胃酸分泌 ( $\mu$ 当量 /60分)	胃運動	
			頻度 (回/60分)	振幅 (cmH <sub>2</sub> O/ 回 /60分)
生理食塩水		17.6 $\pm$ 1.2	1.3 $\pm$ 1.0	1.7 $\pm$ 1.0
ラット グレリン	0.8 $\mu$ g/kg 静注	24.5 $\pm$ 2.2	35.5 $\pm$ 18.1	6.7 $\pm$ 4.4
	4 $\mu$ g/kg 静注	23.5 $\pm$ 2.6	60.8 $\pm$ 25.6	11.1 $\pm$ 5.3
	20 $\mu$ g/kg 静注	43.3 $\pm$ 4.6 (*1)	100.5 $\pm$ 20.4 (*1)	21.8 $\pm$ 2.5 (*1)
ラット グレリン 20 $\mu$ g/kg 静注	+アトロピン 1mg/kg 皮下投与	26.1 $\pm$ 3.9 (*2)	0 (*3)	0 (*3)
	+迷走神経 切除術	18.4 $\pm$ 3.7 (*3)	0 (*3)	0 (*3)
	+ファモチジ ン 1mg/kg 皮下投与	43.0 $\pm$ 4.2	N T	N T

表中の記号は、以下を示す。

\* 1     $p < 0.01$     \* 2     $p < 0.05$     \* 3     $p < 0.01$

5    N T    未試験

#### 実施例 1 5.    グレリンおよびグレリン誘導体の細胞増殖促進作用

グレリン投与による細胞増殖促進作用を調べるために以下の実験を行った。ラットグレリンあるいはチオエーテル型ラットグレリン（化合物  
 10    18 [Cys<sup>3</sup> (octyl)]-hGhrelin) 20 $\mu$ g/kg を ウィスター系雄性ラット (7.5  
 週齢) の尾静脈内に投与した。投与 17 時間後に <sup>3</sup>H-チミジン  
 (<sup>3</sup>H-thymidine) を尾静脈内投与し、その 1 時間後に十二指腸、空腸お  
 よび骨髓を摘出した。これら組織中の DNA 画分への <sup>3</sup>H-チミジンの取  
 込み量を測定し、グレリンおよびグレリン誘導体の細胞増殖促進作用を

調べた。組織を細切後にポリトロンホモジェナイザーでホモジェネートし、その遠心上清をトリクロロ酢酸で沈澱させ、DNA 画分を取得した。DNA 画分の放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

- 第 2 2 表に示すように、ラットグレリンあるいはチオエーテル型ラットグレリンの静脈内投与により、これらの組織中あるいは臓器中の DNA への  $^3\text{H}$ -チミジン取込みが促進したことから、グレリンは十二指腸、空腸および骨髄での細胞増殖促進作用を示すことが確認された。

- グレリン静脈内投与後の細胞増殖促進作用のタイムコースは、GHRH(成長ホルモン放出ホルモン) 投与によるものと同様であり、グレリンの細胞増殖促進作用は主に下垂体から分泌される GH(成長ホルモン) を介するものと考えられた。GH 分泌調節を生理的な因子であるグレリンに担わせることは生体調節にとって無理がなく、GH で問題となっている副作用も少ないと考えられた。

第 2 2 表

	比較例	ラットグレリン	チオエーテル型 グレリン
骨髄 (組織中)	100.0 ±17.8%	141.7 ±30.1%	144.5 ±16.5%
十二指腸 (DNA 分画中)	100.0 ±14.2%	136.0 ±17.8%	114.0 ±11.7%
空腸 (DNA 分画中)	100.0 ±6.8%	159.0 ±7.5%	151.0 ±23.6%

- 数値は比較例(生理食塩水投与群)の 3 例の平均値を基準とした時の放射能の取り込み量の比率(%)で示した。

#### 実施例 1 6 抗グレリン抗体によるグレリンの定量

- ラットグレリンのアミノ末端側およびカルボキシル末端側のペプチドを抗原として作成された抗体を用い、ラジオイムノアッセイ(RIA)によって各種生体組織中のグレリンを定量した。

[C-Cys]-ラットグレリン[1-11]（ラットグレリンのアミノ末端側の 1 から 11 番目までのアミノ酸配列を有するペプチドのカルボキシル末端にシステインが結合したペプチド）および[C-Cys]-ラットグレリン[13-28]（ラットグレリンのアミノ末端側の 13 から 28 番目までのアミノ酸配列を有するペプチドのカルボキシル末端にシステインが結合したペプチド）を抗原として、ウサギを免役してN端側抗体（抗[C-Cys]-ラットグレリン[1-11]抗体）とC端側抗体（抗[C-Cys]-ラットグレリン[13-28]抗体）を作成した。

第 9 a 図に示すように、放射能標識したラットグレリンとN端側抗体の結合において、ラットグレリンの IC<sub>50</sub>（半阻害量）は、反応液あたり 3.1 fmol であった。このN端側抗体は、化学合成したヒトグレリンおよびラットグレリンと 100%交差反応性を示したが、3 位のセリンが n-ヘキサノイル基で修飾された n-ヘキサノイル・ラットグレリンおよび 3 位のセリンが n-デカノイルで修飾された n-デカノイル・ラットグレリンとは、各々、0.3%および 20%しか交差反応性を示さなかった。また、N端側抗体は脂肪酸を脱離したグレリンとは全く反応しなかった。

ラットグレリン（28 アミノ酸）、ヒトグレリン（28 アミノ酸）およびヒトやラットなどから見出されたグレリン-27（27 アミノ酸からなるグレリン）に対して、N端側抗体は同等の親和性を示した。従って、N端側抗体は 3 位セリンが n-オクタノイル基で修飾された天然型グレリンを特異的に認識することが確認された。

第 9 b 図に示すように、放射能標識したラットグレリンのC端側抗体に対する結合において、n-オクタノイル基で修飾された天然型ラットグレリンおよび n-オクタノイル基が脱離したラットグレリンの IC<sub>50</sub> は、反応液あたり 44 fmol で同等であった。すなわち、脂肪酸修飾されたグレリンにも脂肪酸が脱離したグレリンにも同等の親和性を示すことが確



認された。

以上の結果を基に、生体内各組織に存在するグレリンについて、N端側抗体によって3位セリンが n-オクタノイル基で修飾されたグレリンを定量し、C端側抗体によって脂肪酸修飾されたグレリンおよび脂肪酸が脱離したグレリンの両方を定量することができることが判った。

第23表は、実際に生体各組織の脂肪酸修飾されたグレリンの含量、および脂肪酸修飾されたグレリンと脂肪酸が脱離したグレリン両方の含量を調べた結果である。

第23表

組織名	抗体と反応したラットグレリンの量 (fmol/mg 組織)	
	C-R I A	N-R I A
視床下部	1.8±0.3	<0.05
下垂体	8.5±3.1	<0.05
甲状腺	3.5±2.0	<0.05
下顎腺	8.8±1.3	<0.05
胸腺	3.5±0.4	<0.05
副腎	3.1±0.4	<0.05
心房	2.3±0.2	0.07±0.01
心室	2.1±0.1	<0.05
大動脈	2.4±0.7	0.14±0.03
肺	3.1±0.4	<0.05
肝臓	2.8±0.5	<0.05
すい臓	2.6±0.6	0.15±0.05
胃	1779.8±533.9	377.31±55.83
十二指腸	106.7±7.3	20.57±0.69
空腸	60.2±17.2	10.73±5.44
回腸	20.5±5.1	0.16±0.08
盲腸	15.1±2.5	1.70±5.44
結腸	10.4±0.7	<0.05
腎臓	5.4±0.3	<0.05
精巣	2.8±0.2	<0.05
血漿 (1 mL)	219.6±71.8	4.02±1.91

表中、C-R I Aは、C端側抗体を用いたラジオイムノアッセイ法によ

る定量結果を表し、N-R I Aは、N端側抗体を用いたラジオイムノアッセイ法による定量結果を表す。

また、表中の数値は、「値±標準偏差」を表す。

## 5 実施例 17 半合成法による ratGhrelin(1-28)の製造 合成スキーム

rGhrelin(6-28)と Ghrelin(1-7)を、それぞれ遺伝子工学的手法と化学合成法によって調製し、両 Ghrelin 断片から rGhrelin を製造した例を示す。

- 10 具体的には、 $\beta$ -galactosidase97S と rGhrelin(6-28)の間に V8 プロテアーゼと KexII プロテアーゼの切断部位を有するアミノ酸配列 ( -QFE-SRHRR- ) を 有 す る 融 合 蛋 白 質 、  $\beta$ -galactosidase97S-(QFE-SRHRR)- rGhrelin(6-28)を大腸菌で発現させた。本融合タンパク質を V8 プロテアーゼ処理し、SRHRR-rGhrelin(6-28)
- 15 を切り出した。次に、SRHRR-rGhrelin(6-28)の全アミノ基を Boc 基で保護した後、KexII プロテアーゼ処理し、新たに 6 位 Ser のアミノ末端アミノ基が遊離した [Lys(Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28)を得た。本保護断片と化学合成法で得られた [N<sup>α</sup>-Boc]- rGhrelin(1-5)-OSu とをフラグメント縮合し、得られた [Lys(Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin を酸処理する
- 20 ことで rGhrelin を製造した。

本実施例では rGhrelin の半合成例を示したが、ヒト型も本方法で合成できる。

- また、本実施例ではフラグメント縮合を (1-5) と (6-28) で実施したが、例えば化学合成したアミノ末部断片 (1-2) , (1-3) 、あるいは (1
- 25 -7) と、それぞれ 28 位から 3 位までの随意の長さを有する Ghrelin のカルボキシル末部断片との融合蛋白質を遺伝子工学的に作成したカルボ

- キシル末部断片 (3-28)、(4-28)、あるいは (8-28) との縮合などが可能である。化学合成の工数を軽減する場合、(1-2) と (3-28) あるいは (1-3) と (4-28) での縮合が有利である。また、縮合によるラセミ化を完全に防止する観点からは 7 位 Pro を利用した (1-7) と (8-28) の縮合が特に好ましい。

#### 発現ベクター pG97s rGR の構築と Ghrelin(6-28) 融合蛋白質の発現

- rat Ghrelin の cDNA 遺伝子配列に基づき、アミノ酸配列 QFE-SRHRR をプレプロ領域に持つ rGhrelin(6-28) の DNA 断片を、全合成オリゴマーを用いてアニーリング法により得た。

- この DNA 断片を pG97SnPPH34 (特開平 9-296000) に挿入するため、まず pG97SnPPH34 を SalI および SmaI 処理により、ヒト副甲状腺ホルモン前駆体遺伝子を欠失させた。このものをアルカリホスファターゼ処理後、先に SalI 処理、kinase 処理を施した rGhrelin 誘導体遺伝子断片と T4 リガーゼにより連結させた。連結したプラスミドを大腸菌 DH5  $\alpha$  株に形質転換し、プラスミド pG97s rGR を得た。

- 得られた pG97s rGR を大腸菌 M25 (*ompT*) 株に形質転換を行い、得られた形質転換株を 200ml の Terrific Bloth 液体培地 (1.2% トリプトン、2.4% 酵母エキス、0.4% グルコース) 3 本に接種し、37℃ で振盪培養した。菌体濃度が OD<sub>660</sub>=0.8 になった時点でイソプロピル 1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度 2mM になるように添加し、rGhrelin(6-28) 融合蛋白質を発現させた。さらに 4 時間培養後、遠心分離し、菌体を回収した。ラット Ghrelin(6-28) 融合蛋白質の構成を以下に示す。

- ラット Ghrelin6-28 融合蛋白質: ( $\beta$ -galactosidase-97S)-QFE-SRHRR-rGhrelin(6-28)

rGhrelin6-28 融合蛋白質のプロセッシングと  
[SRHRR]-rGhrelin(6-28)の精製

得られた菌体 20ml を TE バッファーに懸濁後、French Press にて菌体  
破碎した。その後、3000rpm、15 分の遠心分離で封入体を回収し、10ml TE  
5 バッファー、脱イオン水で再度懸濁し、遠心分離することで封入体を洗  
浄した。OD<sub>660</sub> の値が 50.0 になるように封入体を脱イオン水で希釈し、  
Tris-HCl (pH8.2) を終濃度 50mM になるように加え、尿素（終濃度 3.5M）  
により封入体を溶解させた。30℃に保温した本溶液に、rV8 プロテアー  
ゼ誘導体 V8D5（以下 V8D5 と記す）（特開平 9-47291）を終濃度 10 μg/ml  
10 になるよう添加し、30℃で 20 分酵素処理を行った。3%酢酸（AcOH）を添  
加して反応を停止させた。

切り出された [SRHRR]-rGhrelin(6-28)を含む V8D5 酵素反応停止液に  
1.5 倍量の脱イオン水を加え、5N NaOH を用いて pH5.0 に調整し、βガラ  
クトシダーゼ誘導体断片を沈殿、5000rpm で 10 分間遠心分離して除去し  
15 た。

[SRHRR]-rGhrelin(6-28)を含む上清を、0.1%TFA で平衡化した TSK-ODS  
80Ts カラム（粒径 20μm、50 mm I.D. x 100mm、TOSOH 社製）に添加した。  
バッファーA [ 0.8ml/min、1%アセトニトリル、0.1%TFA ] 100%からバッ  
ファーB [ 50%アセトニトリル、0.095%TFA ] 100%の濃度勾配を 5 カラム  
20 容量で完了するプログラムで溶出を行った。目的ペプチド  
[SRHRR]-rGhrelin(6-28)を含む画分を分取した（約 50mg）。

[Boc-SRHRR]-[Lys(Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28)の調製

約 50 mg (15 μmol) の [SRHRR]-rGhrelin (6-28)を含む 50%アセトニ  
トリル水溶液に、二炭酸ジ-t-ブチルを 6 当量モル(19.2 mg, 6 x 15 μmol)  
25 加え、トリエチルアミンにて pH9 に調整し、室温で 15 分放置した。反応  
液に終濃度 0.5%になるように酢酸を添加し、アセトニトリルを留去した

後、0.1% TFA を含む 10% アセトニトリルで平衡化した EMPORE-Octyl (C8)HD 4mm/1ml cartridge に添加し、平衡化液で洗浄後、0.095% TFA を含む 90% アセトニトリルで [Boc-SRHRR]-[Lys (Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28)を溶出した。アセトニトリルを留  
5 去し、約 30 mg の目的物を含む溶液を 6mL 得た。

質量分析の結果、Boc 化前（測定分子量＝3396、理論上分子量＝3398）に比べ Boc 化後では分子量が 500 多くなったもの（測定分子量 3395）と、600 多くなったもの（測定分子量＝3995）の 2 種類が主に見られた。

10 Kex2 プロテアーゼによる [Lys (Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28)の切り出しと精製

得られた [Boc-SRHRR]-[Lys (Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28) 水溶液 (30mg, 6mL)に塩化カルシウム溶液、Tris-HCl pH8.2 をそれぞれ終濃度 0.3mM、20mM になるように添加した。Kex2 プロテアーゼ（特開平 10 -  
15 229884）溶液を  $1 \times 10^5$  unit/ml になるように添加後、30℃、60 分間プロテアーゼ処理した。

HPLC 上、[Boc-SRHRR]-[Lys (Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28)のピークが消失し、[Lys (Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28)のピークがより疎水性側に現われ、Boc-SRHRR に対応する親水性のピークが観察された。

20 原料消失を確認後、反応液を酢酸水で pH3.5 に調整し、1% 酢酸を含む 1.0%アセトニトリルで平衡化した逆相クロマトカラム ODS-80Ts (1.66cc カラム容積、粒径 20um, TOSOH 社製)に添加した。平衡化液で 5 カラム容積で洗浄後、1%酢酸を含む 1.0%アセトニトリルから 90.0%アセトニトリルへの濃度勾配を 5 カラム容積にて完了するプログラムを行い、  
25 [Lys (Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28)を溶出させた。主画分を凍結乾燥し、目的とする保護ペプチドを 6.2mg 得た。

## フラグメント縮合と脱保護

Ghrelin(1-5) (190 mg, 0.0301 mmol, 化合物 3 1) のトリフルオロエ  
タノール (TFE) 溶液 (6.00 ml) にトリエチルアミン (51.0  $\mu$ l, 0.366  
mmol)、二炭酸ジ-*t*-ブチル (78.0 mg, 0.0356 mmol) の TFE 溶液 (4.00 ml)  
5 を加え、室温で 13 時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、得られた残査に  
エーテル (20.0 ml) を加え、[*N* $^{\alpha}$ -Boc]-rGhrelin(1-5) を 180.5 mg 得  
た。

次に、[*N* $^{\alpha}$ -Boc]-rGhrelin(1-5) (22.0 mg, 0.0301 mmol) の DMF (1.00  
ml) 溶液に HOSu (5.20 mg, 0.0452 mmol) を加えた後、-30℃浴中 DIPCI  
10 (7.30  $\mu$ l, 0.0466 mmol) を加えた。-30℃浴で 1 時間、室温で 18 時間  
攪拌した後、溶媒を減圧下留去し、得られた残査をエーテルで粉末とし、  
[*N* $^{\alpha}$ -Boc]-rGhrelin(1-5) のサクシンイミドエステル体 [*N* $^{\alpha}$ -Boc]-  
rGhrelin(1-5)-OSu を 14.1 mg 得た。

次に、リコンビナント法により調製した  
15 [Lys(Boc)<sup>11, 16, 19, 20, 24</sup>]-rGhrelin(6-28) (6.10 mg, 2.18  $\mu$ mol) の DMF (0.6  
ml) 溶液に、[*N* $^{\alpha}$ -Boc]-rGhrelin(1-5)-OSu (3.3 mg, 3.96  $\mu$ mol)、トリ  
エチルアミン (2.5  $\mu$ l, 17.9  $\mu$ mol) を加え室温で 24 時間攪拌した。溶  
媒を減圧下留去し、得られた残査に氷冷下、直接 TFA (2.00 ml) を加え、  
室温で 1.5 時間攪拌した。TFA を減圧下留去した後、残査にエーテルを  
20 加え rGhrelin(1-28) を含む粗ペプチド 6.2 mg を得た。

本品を 5% 酢酸 (AcOH) 2 ml に溶かし、YMC-Pack-ODS-A (5  $\mu$ m, 20 mm  
x 250 mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 0% から  
95% までの 60 分間直線グラジエント (流速: 10 ml/min) で溶出させた。  
目的画分を分取後凍結乾燥し、更に YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 10 mm x  
25 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 7.5% から  
21.3% までの 30 分間直線グラジエント (流速: 4.7 ml/min) で溶出させた。

目的画分を分取後、凍結乾燥し、更に YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 10 mm x 250mm) に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル 7.5% から 21.3% までの 30 分間直線グラジエント (流速: 4.7 ml/min) で溶出させた。

目的画分を分取後、凍結乾燥し、rGhrelin(1-28) を 2.1 mg 得た。

- 5 rGhrelin(1-28) を 2.1 mg 得た。このものは、分析用 HPLC において標準品の rGhrelin(1-28) と保持時間が一致し、細胞内カルシウム上昇活性は  $EC_{50}=1.5 \text{ nM}$  と天然品と同等であった。

ESI-MS 3315.0 (理論値 3314.8), アミノ酸組成比: Ser; 3.74 (4), Glx; 5.69 (6), Gly; 1.18 (1), Ala; 2.05 (2), Leu; 2, Phe; 0.98 (1), Lys; 10 4.98 (5), His; 1.03 (1), Arg; 1.96 (2), Pro; 4.01 (4)

化合物 87  $[^{\text{D}}\text{leu}^5]$ -rGhrelin(1-28)

- また、 $[N^{\alpha}\text{-Boc}]$ -rGhrelin(1-5) のサクシンイミドエステル化、あるいはフラグメント縮合時の副反応物として、 $[^{\text{D}}\text{leu}^5]$ -rGhrelin(1-28) が 0.8 mg 得られた。このものの細胞内カルシウム上昇活性は  $EC_{50}=220 \text{ nM}$  であ  
15 った。

ESI-MS 3315.0 (理論値 3314.8), アミノ酸組成比: Ser; 3.80 (4), Glx; 5.92 (6), Gly; 1.23 (1), Ala; 2.07 (2), Leu; 2, Phe; 0.97 (1), Lys; 4.92 (5), His; 1.02 (1), Arg; 1.97 (2), Pro; 4.11 (4)

- $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$  加水分解後のロイシンの GC-MS 分析: L-Leu; 1.17 (1),  
20 D-Leu; 0.83 (1)

#### 産業上の利用可能性

- 本発明の新ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩は、人又は動物に投与することによって GH の分泌を誘導し、実質的な副作用を伴  
25 うことなく、小児の成長促進及び成人の GH 欠乏により代謝機能の欠損を改善する医薬として、そしてその抗体は GH 欠乏により疾病の診断にさら

には学術分野の研究ツールとして優れた作用効果を奏する。



## 請求の範囲

1. 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドの少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ  
5 酸化合物により置換されていることを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
2. (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつ該アミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのア  
10 ミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む請求の範囲第 1 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
3. 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 2 項記載のペプ  
15 チド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
4. 配列番号 25、26、29、30、31、32、34 および 35 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 2 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 20 5. 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドの (a) 構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ (b) 少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 25 6. 配列番号 27、28 および 33 記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 又は 5 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容され

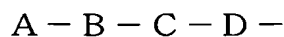
る塩。

7. (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列以外  
5 の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む請求の範囲第 5 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

8. 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22 および 23 記載のアミノ酸配列からなる群から  
10 選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 7 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

9. 配列番号 25、26、29、30、31、32、34 および 35 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求の範囲第 7 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容  
15 される塩。

10. アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が、下記の式で表される請求の範囲第 1 又は 5 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。



20 A ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

B ; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

(ただし、A + B の分子鎖長がジペプチド相当長ある。)

C 又は D ; 同一であっても異なってもよく、(a) 修飾されたアミノ酸、(b) 疎水性側鎖を有するアミノ酸、又は (c) 塩基性側鎖を有  
25 するアミノ酸、  
を表す。

- 1 1. Cが、アミノ酸の $\alpha$ 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエーテル、アミドまたはジスルフィド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b)炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸であり、Dが疎水性側鎖を有するアミノ酸であることを特徴とする請求の範囲第10項に記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 1 2. 配列番号2、3、9、10、11、16、17、22、25、26、27、28、29、30および31記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列において、アミノ末端の1番目から4番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が請求の範囲第10または11項に記載のペプチド系化合物であるペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 1 3. 修飾されたアミノ酸がアミノ末端から3番目のアミノ酸である請求の範囲第1、2、3、5、7または8項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 1 4. 修飾されたアミノ酸におけるアミノ酸がセリン又はシステインであることを特徴とする請求の範囲第13項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 20 1 5. アミノ酸の $\alpha$ 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b)H又は炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入した修飾アミノ酸を含有する請求の範囲第1、2、25 3、5、7または8項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

- 1 6. 修飾アミノ酸が、アミノ酸の $\alpha$ 炭素に、(a)炭素数1以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、カルバミド又はチオカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、
- 5 又は(b)炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入したアミノ酸である請求の範囲第1、2、4、5、6、7、9、10または12項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 1 7. エステル結合により修飾された修飾アミノ酸を有する請求の範囲第1、2、3、5、7または8項記載のペプチド系化合物又はその薬
- 10 学的に許容される塩。
- 1 8. アミノ酸の側鎖の官能基がエステル結合を形成することにより修飾された修飾アミノ酸を有する請求の範囲第1、2、4、5、6、7、9、10、11または12項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 15 1 9. アミノ酸の側鎖の水酸基に脂肪酸がエステル結合したアミノ酸を有する請求の範囲第17項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 2 0. 脂肪酸が、アミノ酸の側鎖の水酸基にエステル結合又はメルカプト基にチオエステル結合したアミノ酸を有する請求の範囲第18項記
- 20 載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 2 1. 炭素数が2乃至35である脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求の範囲第19項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 2 2. 脂肪酸が炭素数2乃至35である請求の範囲第20項のペプチド
- 25 系化合物又はその薬学的に許容される塩。
- 2 3. 炭素数が2、4、6、8、10、12、14、16および18

の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸が結合したアミノ酸を有する請求の範囲第 2 1 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

- 2 4. 脂肪酸が炭素数 2、4、6、8、10、12、14、16 および  
5 18 の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸である請求の範囲第 2 2 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

2 5. 結合した脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求の範囲第 2 3 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

- 10 2 6. 脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求の範囲第 2 4 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

- 2 7. 結合した脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求の範囲第 2 3 項記載の  
15 ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

2 8. 脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求の範囲第 2 4 項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

- 2 9. 請求の範囲第 1 乃至 2 8 項記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端に、更に塩基性アミノ酸が結合していることを特徴とするペプチド系化合物。  
20

- 3 0. アミノ末端が炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub> (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基、R<sub>2</sub> 及び R<sub>3</sub> は H 及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示  
25

す)であることを特徴とする請求の範囲第1, 2, 3, 5, 7, 8, 13, 14, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27項記載のペプチド系化合物。

31. アミノ末端のアミノ基が、炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル基又はアシル基の導入により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基のOHがOZ又はNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>(Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基を示し、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す。)であることを特徴とする請求の範囲第1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 29項記載のペプチド系化合物。

32. 請求の範囲第30または31項記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端アミド誘導体に、更に塩基性基を導入したことを特徴とするペプチド系化合物。

33. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物。

34. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物。

35. 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための医薬組成物。

36. ヒト以外の動物に適用するための請求の範囲第33乃至35項記載の医薬組成物。

37. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物又はその薬

学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

38. 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法。

39. ヒト以外の動物に適用するための請求の範囲第37又は38項記載の治療方法。

40. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAであって、当該DNAがコードするアミノ酸配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該DNA。

41. 塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21、24、36、37、38および39記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列である請求の範囲第40項記載のDNA。

42. 塩基配列が、配列番号6、7、14、15、20、21、24、36、37、38および39記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列中、アミノ酸をコードしている塩基配列である請求の範囲第40項記載のDNA。

43. 請求の範囲第40乃至42項記載のDNAを有するベクター。

44. 請求の範囲第43項記載のベクターを含有する細胞。

45. 請求の範囲第40乃至42項記載のDNAを有するベクターを有し、且つ当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として産生することができる細胞。

46. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物に対する抗

体。

47. 請求の範囲第46項記載の抗体を用いて請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアッセイ方法。

5 48. 請求の範囲第46項記載の抗体を用いて請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物の検出用キット。

49. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求の範囲第40乃至42項記載のDNAを含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物の製造方法。

15 50. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求の範囲第40乃至42項記載のDNAを含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物の製造方法。

20 51. 請求の範囲第19乃至28項記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、脂肪酸をアミノ酸の側鎖の水酸基にエステル結合又はメルカプト基にチオエステル結合させる活性を有する細胞を用いることを特徴とする請求の範囲第19乃至28項記載のペプチド系化合物の製造方法。

25 52. 配列番号8記載のアミノ酸配列中のセリンの側鎖の水酸基に脂



脂肪酸をエステル結合させるセリンアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする請求の範囲第19乃至28項記載のペプチド系化合物の製造方法。

5 3. 配列番号28記載のアミノ酸配列中のトレオニンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする請求の範囲第19乃至28項記載のペプチド系化合物の製造方法。

5 4. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

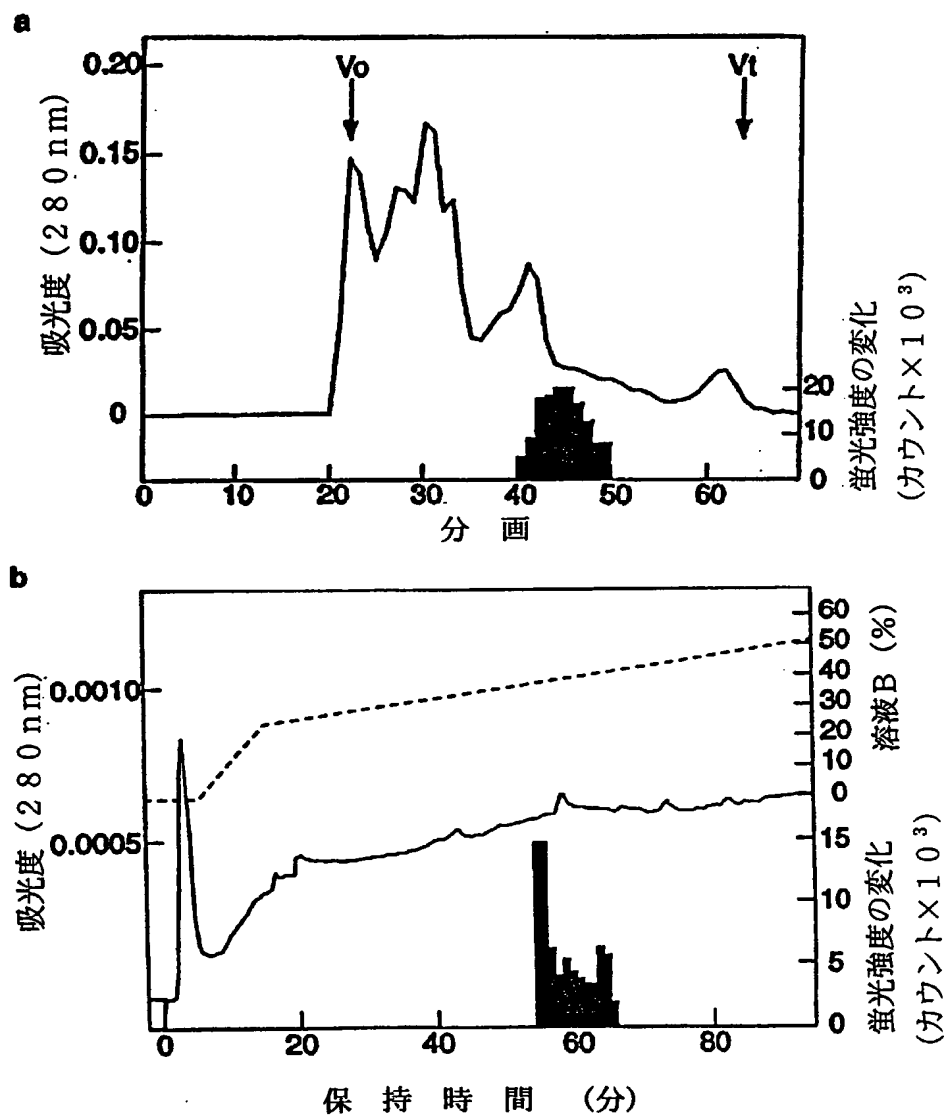
5 5. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

5 6. 請求の範囲第1乃至32項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

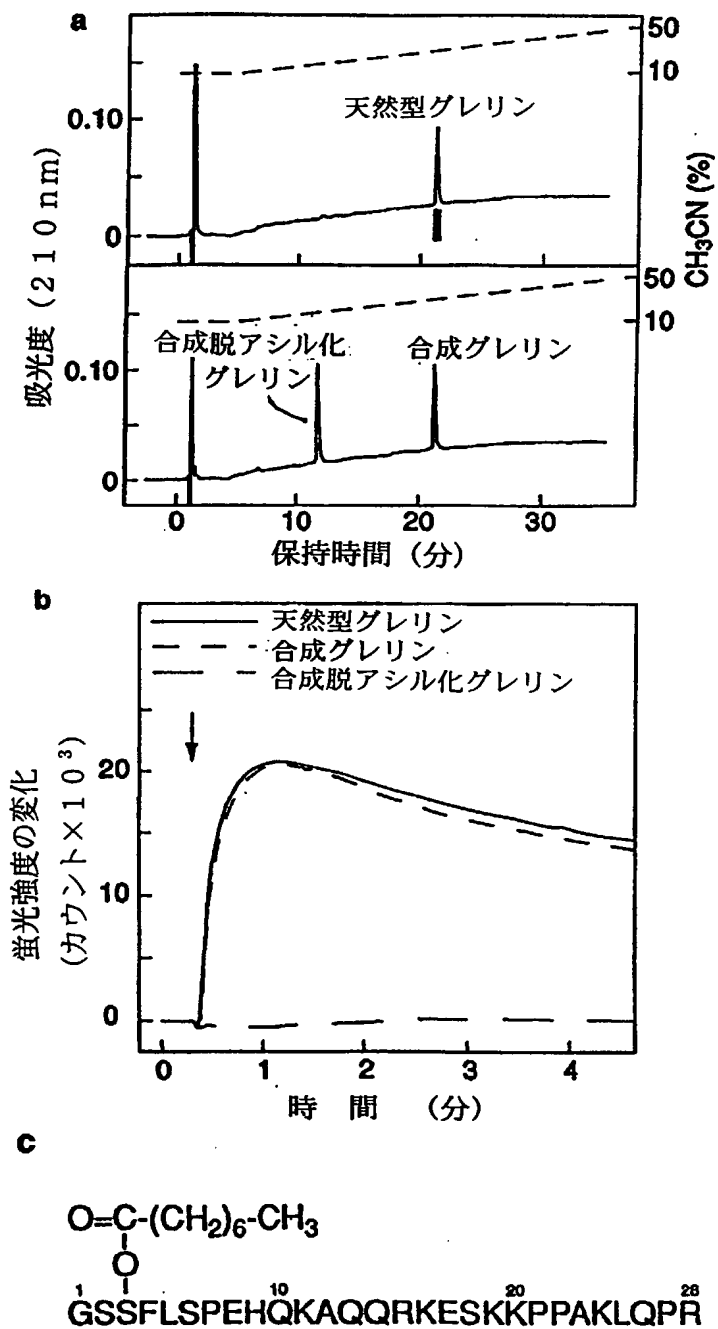
- 5 7. 請求の範囲第 1 乃至 3 2 項記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法。

## 図 面

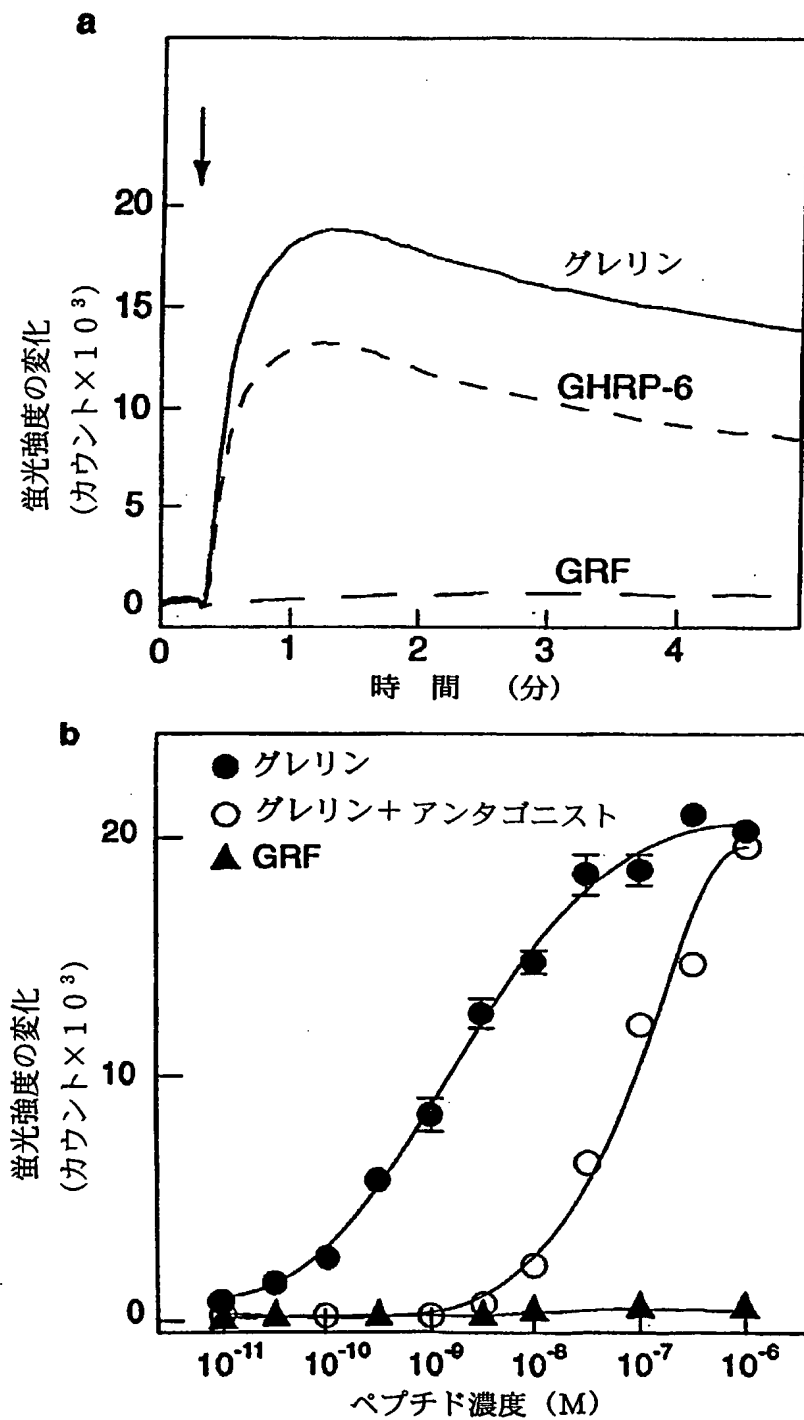
第 1 図



第2図



第3図

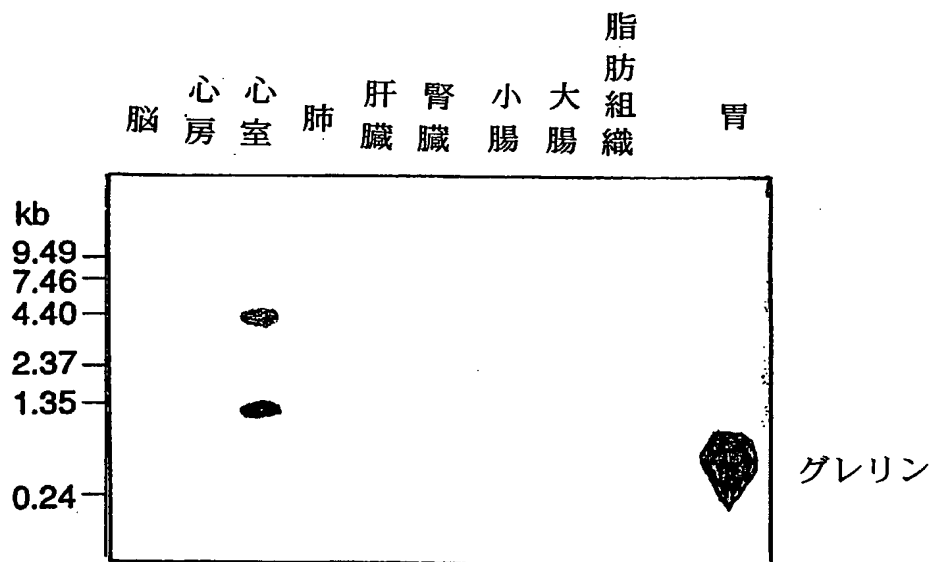


## 第4図

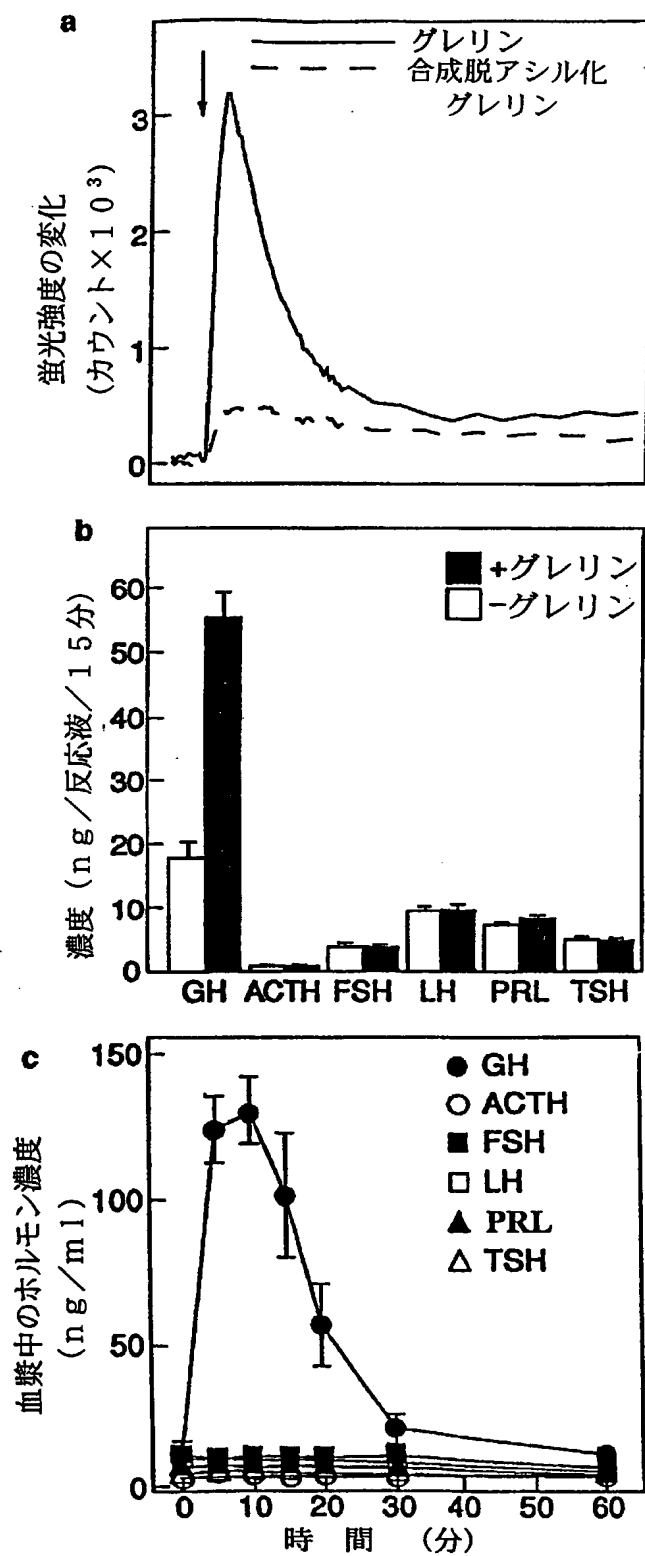
a

ヒト	1	MPSPGTVCSLLLLGMLWLDL	MAGSSFLSP	30
ラット	1	MVSSATICSLLLLSMLWMDM	MAGSSFLSP	30
ヒト	31	EHQRVQORKE	SKKPPAKLOPRALAGWLRPE	60
ラット	31	EHQKAQORKE	SKKPPAKLOPRALEGWLHPE	60
ヒト	61	DGGQAE	GAEDELEVRFNAPFDVGIKLSGVQ	90
ラット	61	DRGQAE	EAEELEIRFNAPFDVGIKLSGAQ	90
ヒト	91	YQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK		117
ラット	91	YQQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPANK		117

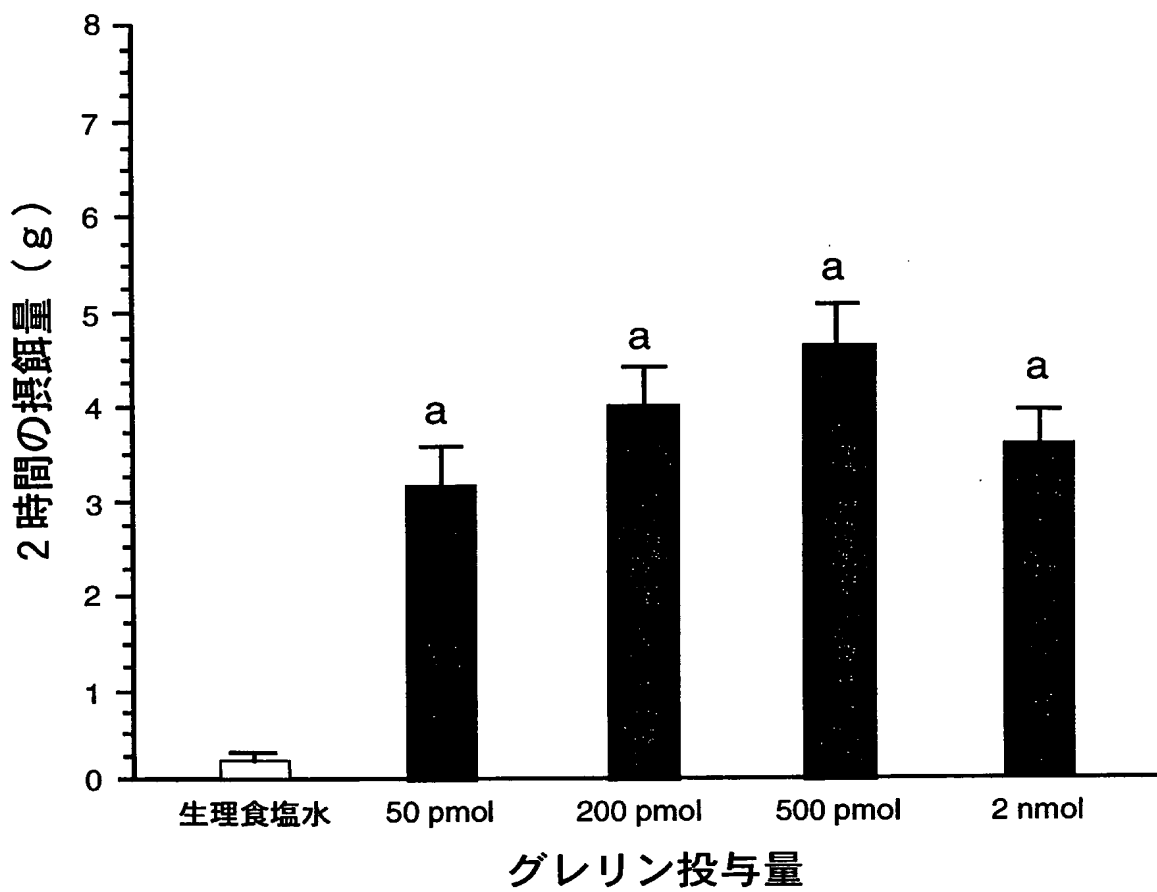
b



第5図



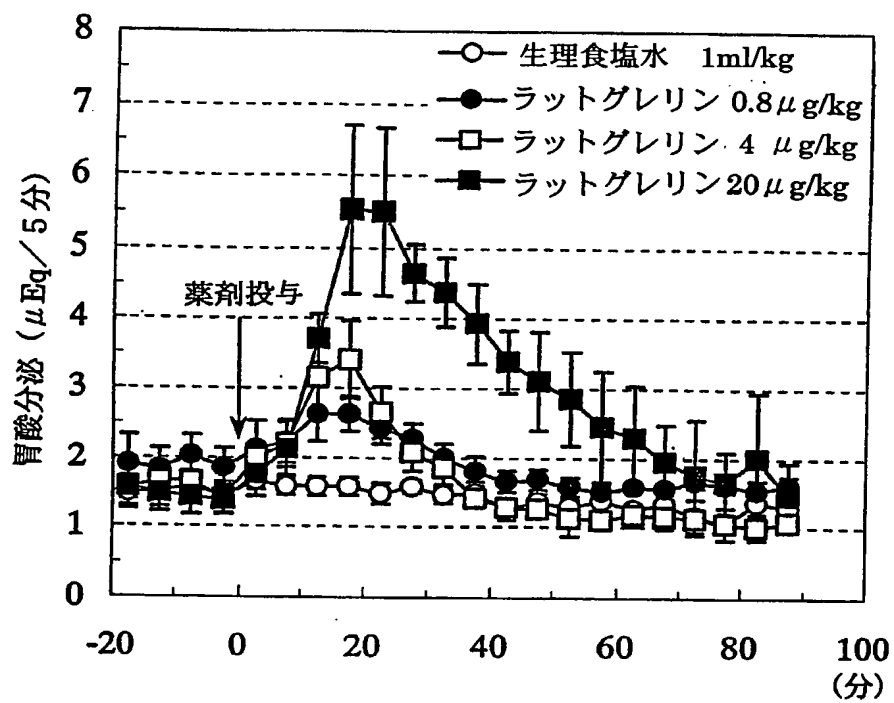
第6図



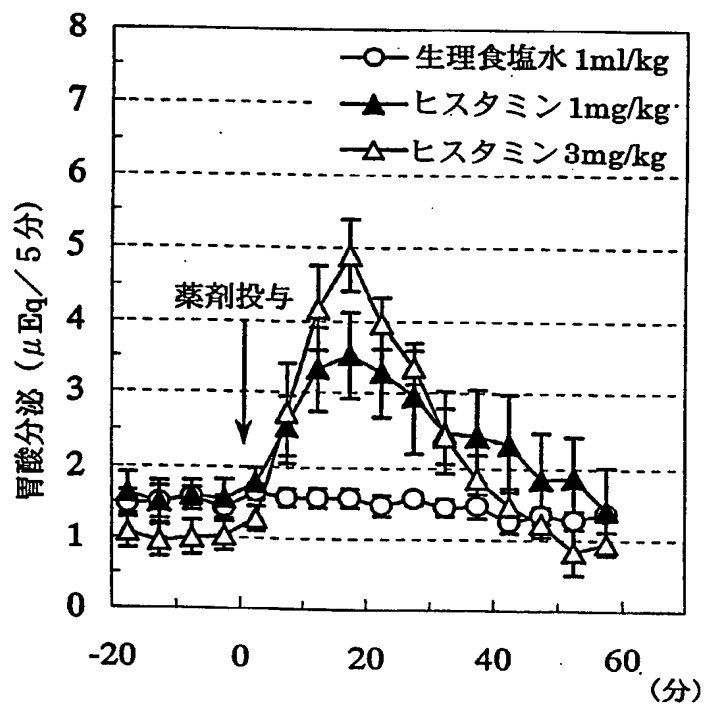


第7図

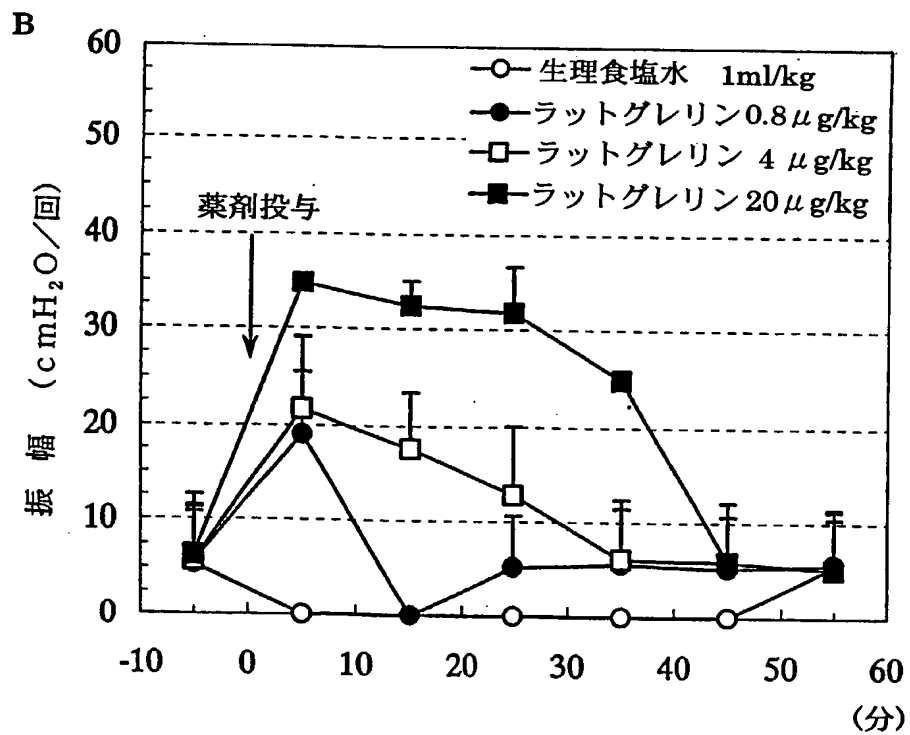
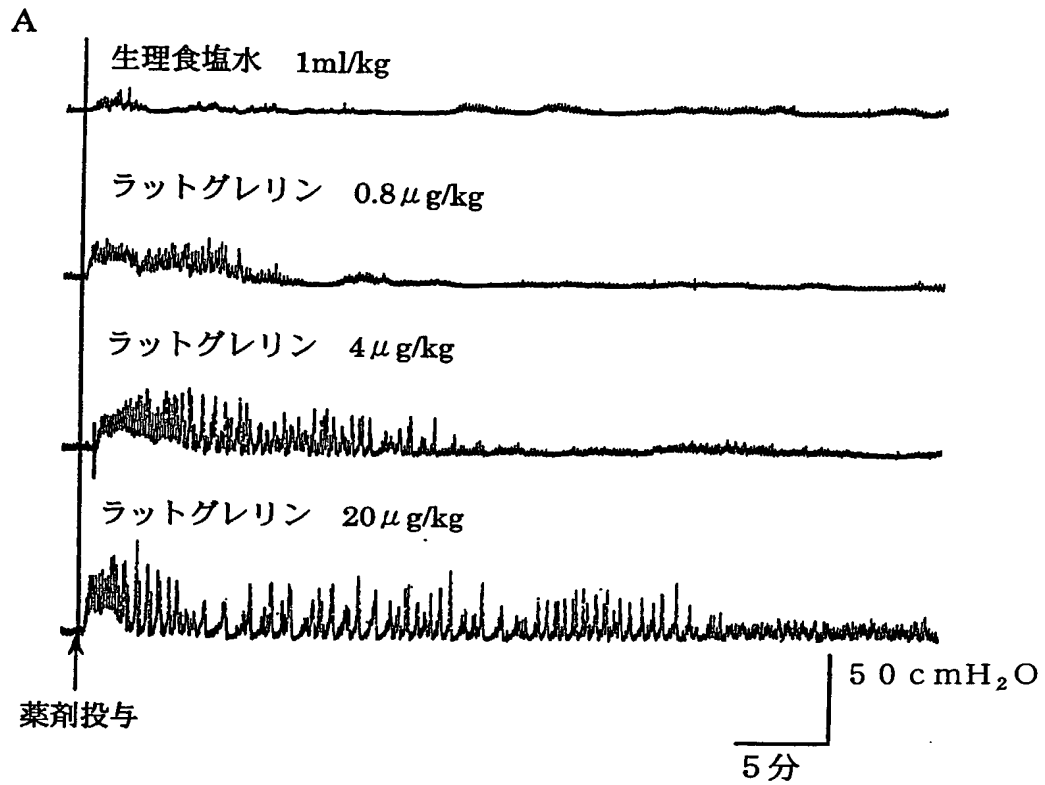
A



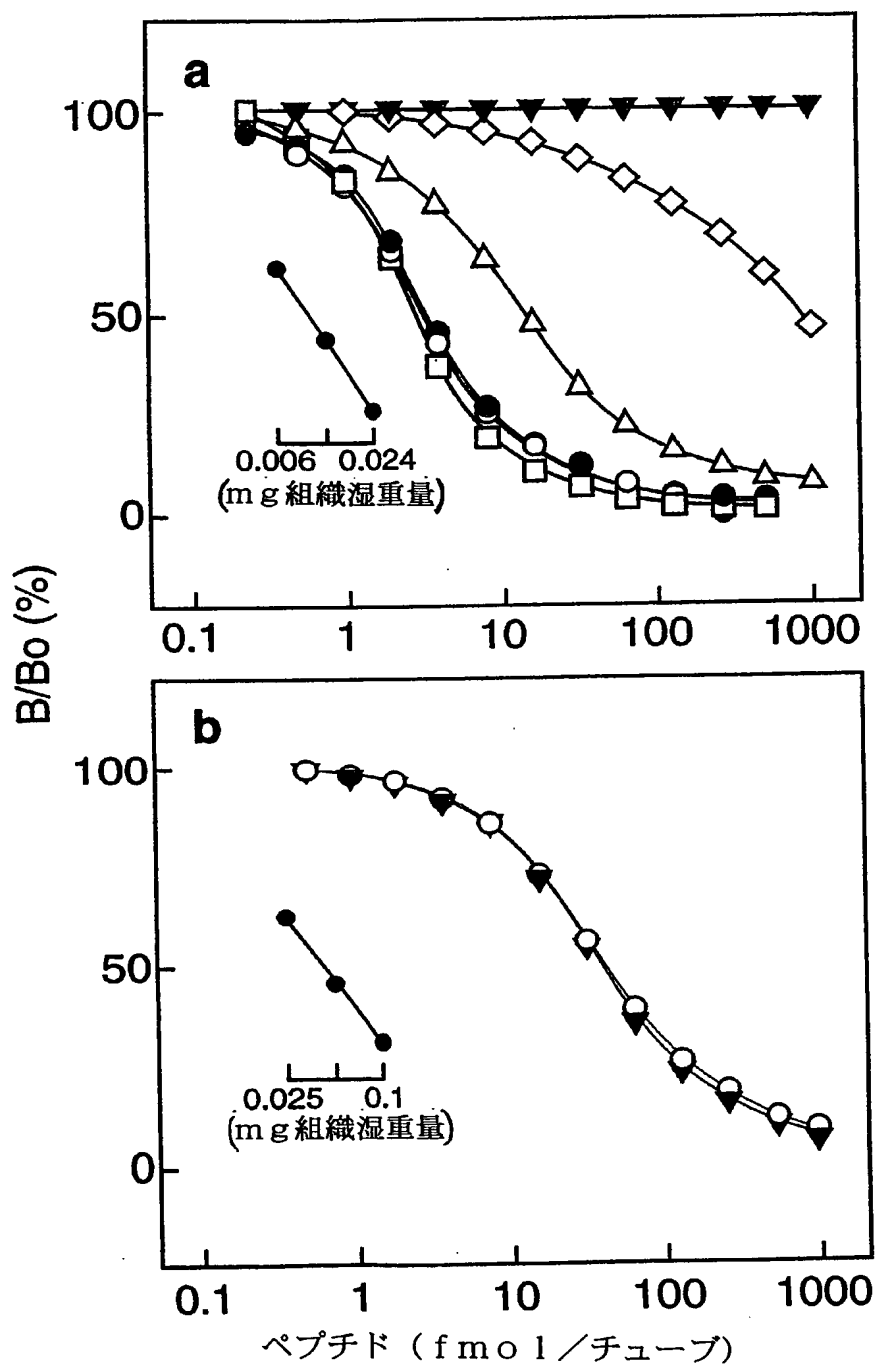
B



第8図



第9図



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Kangawa, Kenji

&lt;120&gt; New Peptides

&lt;130&gt; DS03F216

&lt;150&gt; JP 11-210002

&lt;151&gt; 1999-7-23

&lt;150&gt; JP 11-338841

&lt;151&gt; 1999-11-29

&lt;150&gt; JP 2000-126623

&lt;151&gt; 2000-4-26

&lt;160&gt; 39

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

1

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;223&gt; Amino acid sequence for rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys

1

5

10

15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

2/25

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg  
 20 25

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;223&gt; Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;4

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu  
 1 5 10 15  
 Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His  
 20 25 30  
 Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu  
 35 40 45  
 Gln Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln  
 50 55 60  
 Ala Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe  
 65 70 75 80  
 Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg  
 85 90 95  
 Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu  
 100 105 110  
 Ala Pro Ala Asn Lys  
 115

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

3/25

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 5

```

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
 1             5             10            15
Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
      20             25             30
Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu
      35             40             45
Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln
      50             55             60
Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe
      65             70             75             80
Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
      85             90             95
Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
      100            105            110
Ala Pro Ala Asp Lys
      115

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 501

&lt;212&gt; cDNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (31)... (381)

&lt;223&gt; Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 6

```

tccagatcat ctgtcttcac caccaaggcc atg gtg tct tca gcg act      48
                Met Val Ser Ser Ala Thr
                1             5
atc tgc agt ttg cta ctc ctc agc atg ctc tgg atg gac atg gcc atg      96
Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu Trp Met Asp Met Ala Met

```

4/25

10	15	20	
gca ggt tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag cag aga	144		
Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg			
25	30	35	
aag gaa tcc aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa	192		
Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu			
40	45	50	
ggc tgg ctc cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag	240		
Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu			
55	60	65	70
gag ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg	288		
Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu			
75	80	85	
tca gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt	336		
Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu			
90	95	100	
cag gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag	381		
Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys			
105	110	115	
taaccactga caggactggc cccgtgactt tcctcctaag caagaactca catccagctt	441		
ctgccctctc tgcaactccc agcactctcc tgcctgactta caaataaatg ttcaagctgt	501		

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 511

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (34)... (384)

&lt;213&gt; Homo sapiens

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous peptides  
of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;7

gcaggccac ctgctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca 45

Met Pro Ser Pro

1

ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg 93

5/25

Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu  
 5 10 15 20  
 gcc atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag 141  
 Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln  
 25 30 35  
 cag aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct 189  
 Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala  
 40 45 50  
 cta gca ggc tgg ctg cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca 237  
 Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala  
 55 60 65  
 gag gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc 285  
 Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile  
 70 75 80  
 aag ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag 333  
 Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys  
 85 90 95 100  
 ttt ctt cag gac atc ctg tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac 381  
 Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp  
 105 110 115  
 aag tgatgcacca caagccttac tcacctctct ctaagttag aagcgctcat 434  
 Lys  
  
 ctggcttttc gcttgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga 494  
 ataaatgttc aaactgt 511

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 8

Gly Ser Ser Phe



6/25

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;223&gt; Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 9

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln

1

5

10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;223&gt; Amino acid sequence for rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 10

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu

1

5

10

15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Amino acid sequence for human endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 11

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu

1

5

10

15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 116

7/25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;223&gt; Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 12

```

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu
 1             5             10             15
Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
          20             25             30
Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln
          35             40             45
Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala
          50             55             60
Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp
 65             70             75             80
Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala
          85             90             95
Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala
          100            105            110
Pro Ala Asn Lys
          115

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 13

```

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu
 1             5             10             15
Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His
          20             25             30
Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln
          35             40             45
Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala

```

50					55					60									
Glu	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe	Asp				
65					70					75					80				
Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Ser	Gln	Ala				
					85					90					95				
Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala				
					100					105					110				
Pro	Ala	Asp	Lys																
115																			

<210> 14

<211> 498

<212> cDNA

〈213〉 *Rattus norvegicus*

 $\langle 220 \rangle$ 

**<221> CDS**

⟨222⟩ (31)... (378)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 14

tcacgatcat	cigtccac	caccaaggcc	atg	gtg	tct	tca	gcg	act											48
			Met	Val	Ser	Ser	Ala	Thr											
			1				5												
atc	tgc	agt	ttg	cta	ctc	ctc	agc	atg	ctc	tgg	atg	gac	atg	gcc	atg				96
Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Leu	Trp	Met	Asp	Met	Ala	Met				
			10				15					20							
gca	ggt	tcc	agc	ttc	ttg	agc	cca	gag	cac	cag	aaa	gcc	cag	aga	aag				144
Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Lys	Ala	Gln	Arg	Lys				
			25				30					35							
gaa	tcc	aag	aag	cca	cca	gct	aaa	ctg	cag	cca	cga	gct	ctg	gaa	ggc				192
Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly				
			40				45					50							
tgg	ctc	cac	cca	gag	gac	aga	gga	caa	gca	gaa	gag	gca	gag	gag	gag				240
Trp	Leu	His	Pro	Glu	Asp	Arg	Gly	Gln	Ala	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu				
			55				60					65				70			
ctg	gaa	atc	agg	ttc	aat	gct	ccc	ttc	gat	gtt	ggc	atc	aag	ctg	tca				288

9/25

Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser  
                     75                    80                    85  
 gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt cag 336  
 Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln  
                     90                    95                    100  
 gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag 378  
 Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys  
                     105                    110                    115  
 taaccactga caggactggc cctgtactt tcctcctaag caagaactca catccagctt 438  
 ctgccctctc tgcaactccc agcactctcc tgcigactta caataaatg ttcaagctgt 498

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 508

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (34)... (381)

&lt;213&gt; Homo sapiens

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous peptides  
 (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 15

gcaggccac ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca 45  
   Met Pro Ser Pro  
   1  
 ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg 93  
 Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu  
     5                    10                    15                    20  
 gcc atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag 141  
 Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln  
                     25                    30                    35  
 aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct cta 189  
 Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu  
                     40                    45                    50  
 gca ggc tgg ctc cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca gag 237  
 Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala Glu  
                     55                    60                    65

10/25

```

gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc aag      285
Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys
      70              75              80
ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag ttt      333
Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys Phe
      85              90              95              100
ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac aag      381
Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp Lys
      105              110              115
tgatcgccca caagcccttac tcacctctct ctaagtttag aagcgctcat      431

ctggcttttc gcttgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga  491
ataaatgttc aaactgt      508

```

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;223&gt; Amino acid sequence for porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 16

```

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys
  1              5              10              15
Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg
      20              25

```

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;223&gt; Amino acid sequence for porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;17

```

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu
  1              5              10              15
Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg

```

11/25

20

25

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 18

```

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Val Leu
 1             5             10            15
Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu
          20             25             30
His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys
          35             40             45
Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly
          50             55             60
Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro
 65             70             75             80
Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly
          85             90             95
Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr
          100            105            110
Glu Ala Pro Ala Asp Lys
          115

```

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 19

```

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Val Leu
 1             5             10            15
Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu

```



13/25

gac agt ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc cgg ttc 239  
 Asp Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe  
                   65                                  70                                  75  
 aac gcc ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac 287  
 Asn Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp  
                   80                                  85                                  90  
 cag cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa 335  
 Gln His Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu  
                   95                                  100                                  105  
 gag gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc 382  
 Glu Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys  
 110                                  115

caccctctgtt ctcccagcct cctaagggct caccctggctt ccaggacgct tccactatca 442  
 caccagctc tgagggaatgc tagcctggga ggtgaataaa cattcagact gg 494

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 491

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (9)... (359)

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous  
 peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 21

ctgaggcc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc agc ctg ctg ctc ctc 47  
           Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu  
           1                  5                  10  
 agc gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg 95  
 Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu  
           15                  20                  25  
 agc ccc gaa cac cag aaa gtg cag aga aag gag tcc aag aag cca gca 143  
 Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala  
           30                  35                  40                  45  
 gcc aaa ctg aag ccc cgg gcc ctg gaa ggc tgg ctc ggc cca gaa gac 191



14/25

Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp  
                     50                    55                    60  
 agt ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc cgg ttc aac 239  
 Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn  
                     65                    70                    75  
 gcc ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac cag 287  
 Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln  
                     80                    85                    90  
 cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa gag 335  
 His Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu  
                     95                    100                    105  
 gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc 379  
 Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys  
 110                    115

cacctctgtt ctcccagcct cctaagggt caccitggctt ccaggacgct tccactatca 439  
 caccagctc tgagggaatgc tagcctggga ggtgaataaa cattcagact gg 491

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bos taurus

<223> Amino acid sequence for bovine endogenous peptides (27 amino acids)  
 of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 22

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu Leu Gln Arg Lys Glu  
     1                    5                    10                    15  
 Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg  
                     20                    25

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 89

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bos taurus

<223> Partial amino acid sequence for a prepro-form of bovine endogenous  
 peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

15/25

&lt;400&gt; 23

```

Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
 1             5             10             15
Leu Gln Arg Lys Glu Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
      20             25             30
Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Phe Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly
      35             40             45
Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Phe Phe Asn Ile Gly
      50             55             60
Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly
      65             70             75             80
Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu
                        85

```

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 267

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)... (267)

&lt;213&gt; Bos taurus

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 24

```

gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttt ctg agc ccc gaa cat cag gaa   48
Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Glu
 1             5             10             15
ctg cag aga aag gaa gct aag aag cca tca ggc aga ctg aag ccc cgg   96
Leu Gln Arg Lys Glu Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg
      20             25             30
acc ctg gaa ggc cag ttt gac ccg gag gtg gga agt cag gcg gaa ggt  144
Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Phe Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly
      35             40             45
gca gag gac gag ctg gaa atc cgg ttc aac gcc ccc ttt aac att ggg  192
Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Phe Phe Asn Ile Gly
      50             55             60

```

16/25

atc aag cta gca ggg gct cag tcc ctc cag cat ggc cag acg ttg ggg 240  
 Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly  
 65 70 75 80  
 aag ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa 267  
 Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu  
 85

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Gallus domesticus

<223> Amino acid sequence for chicken endogenous peptides of growth hormone  
 secretagogue

&lt;400&gt; 25

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys  
 1 5 10 15  
 Gly Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg  
 20

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Anguilla japonica

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; AMIDATION

&lt;222&gt; 21

<223> Amino acid sequence for eel endogenous peptides of growth hormone  
 secretagogue

&lt;400&gt; 26

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Pro Pro Arg Val  
 20

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 28

17/25

&lt;212&gt; PRT

<213> *Rana cafesbeiana*

&lt;223&gt; Amino acid sequence for frog endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 27

Gly Leu Ser Phe Leu Ser Pro Ala Glu Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met Arg

20 25

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

<213> *Xenopus laevis*<223> Amino acid sequence for frog (*Xenopus laevis*) endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 28

Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met

20 25

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt;AMIDATION

&lt;222&gt; 23

&lt;223&gt; Amino acid sequence for rainbow trout endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 29

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Val Arg Gln Gly

1 5 10 15

Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val

20

18/25

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oncorhynchus mykiss

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; AMIDATION

&lt;222&gt; 20

&lt;223&gt; Amino acid sequence for rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 30

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly Lys

1

5

10

15

Pro Pro Arg Val

20

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Canis familiaris

&lt;223&gt; Amino acid sequence for dog endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 31

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Gln Arg Lys

1

5

10

15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20

25

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Anguilla japonica

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of eel endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 32

Met Lys Arg Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Leu Val Cys Val Leu Ala Leu

19/25

1	5	10	15
Trp Met Asp Ser Val Gln Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln			
20	25	30	
Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp			
35	40	45	
Ser Asp Gly Ile Leu Asp Leu Phe Met Arg Pro Pro Leu Gln Asp Glu			
50	55	60	
Asp Ile Arg His Ile Thr Phe Asn Thr Pro Phe Glu Ile Gly Ile Thr			
65	70	75	80
Met Thr Glu Glu Leu Phe Gln Gln Tyr Gly Glu Val Met Gln Lys Ile			
85	90	95	
Met Gln Asp Leu Leu Met Asp Thr Pro Ala Lys Glu			
100	105		

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 114

&lt;212&gt; PRT

<213> *Xenopus laevis*<223> Amino acid sequence frog (*Xenopus laevis*) endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;33

Met Asn Phe Gly Lys Ala Ala Ile Phe Gly Val Val Leu Phe Cys Leu			
1	5	10	15
Leu Trp Thr Glu Gly Ala Gln Ala Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala			
20	25	30	
Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His			
35	40	45	
Gly Asn Met Asn Arg Arg Gly Val Glu Asp Asp Leu Ala Gly Glu Glu			
50	55	60	
Ile Gly Val Thr Phe Pro Leu Asp Met Lys Met Thr Gln Glu Gln Phe			
65	70	75	80
Gln Lys Gln Arg Ala Ala Val Gln Asp Phe Leu Tyr Ser Ser Leu Leu			
85	90	95	
Ser Leu Gly Ser Val Gln Asp Thr Glu Asp Lys Asn Glu Asn Pro Gln			
100	105	110	
Ser Gln			

20/25

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 82

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oncorhynchus mykiss

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;34

```

Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser
  1             5             10             15
Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Val Arg Gln
          20             25             30
Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser Phe
          35             40             45
Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn Thr
          50             55             60
Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe
          65             70             75             80
Gln Glu

```

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oncorhynchus mykiss

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of rainbow trout endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;35

```

Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala Lys Ser Val Ser
  1             5             10             15
Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro Gln Gly Lys Gly
          20             25             30
Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser Phe Ala Glu Leu
          35             40             45
Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn Thr Ile Lys Ala
          50             55             60
Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu Phe Gln Glu Tyr

```

21/25

65                                      70                                      75                                      80  
 Gly Ala Val Leu Gln Lys Ile Leu Gln Asp Val Leu Gly Asp Thr Ala  
    85                                      90                                      95  
 Thr Ala Glu

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 503

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (66)... (389)

<213> *Anguilla japonica*

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of eel endogenous peptides  
 of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 36

tc caa gaggc actgggtttc ctc taa agt gcaaa actcc actgtgagct tcagacatga 60

ggcag atg aaa cgc acc gca tac atc atc ctg ctg gtc tgc gtc ctg 107

Met Lys Arg Thr Ala Tyr Ile Ile Leu Leu Val Cys Val Leu

1                                      5                                      10

gcg ctg tgg atg gac tct gtc cag gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc 155

Ala Leu Trp Met Asp Ser Val Gln Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

15                                      20                                      25                                      30

tca cag aga ccg cag ggg aag gat aag aag cct ccc agg gtt ggc aga 203

Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Asp Lys Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg

35                                      40                                      45

cga gac tca gat ggg atc ctg gac ctg ttt atg agg ccc cca ttg cag 251

Arg Asp Ser Asp Gly Ile Leu Asp Leu Phe Met Arg Pro Pro Leu Gln

50                                      55                                      60

gat gaa gac atc aga cac att acg ttt aac act cct ttt gag atc ggg 299

Asp Glu Asp Ile Arg His Ile Thr Phe Asn Thr Pro Phe Glu Ile Gly

65                                      70                                      75

atc acc atg act gag gag ctg ttc cag caa tat gga gaa gtg atg cag 347

Ile Thr Met Thr Glu Glu Leu Phe Gln Gln Tyr Gly Glu Val Met Gln

80                                      85                                      90

aag atc atg cag gat ttg ctg atg gac aca cct gcc aaa gag 389



22/25

Lys Ile Met Gln Asp Leu Leu Met Asp Thr Pro Ala Lys Glu

95

100

105

tgacaagagt ggatatgatac tggacttcat aaaaccctgc gtcccatata ttcttgcat 449

atigcatgca taattcaacc aatigttaaa catttaataa aattttgcaa acgc 503

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 484

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (47)... (388)

<213> *Xenopus laevis*

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of frog  
 (*Xenopus laevis*) endogenous peptides of growth hormone  
 secretagogue

&lt;400&gt; 37

tttcactttt atctcgcagg cggcaccggt gaccaggacc ttcagg 46

atg aat ttt ggt aaa gcc gcc atc ttt ggg gtt gtc ttg ttc tgc ctg 94

Met Asn Phe Gly Lys Ala Ala Ile Phe Gly Val Val Leu Phe Cys Leu

1

5

10

15

ctg tgg acg gag ggg gcc cag gct ggc ttg acc ttc ctg agt cca gcc 142

Leu Trp Thr Glu Gly Ala Gln Ala Gly Leu Thr Phe Leu Ser Pro Ala

20

25

30

gac atg cag aag att gcg gag agg caa tca cag aat aag ctg aga cac 190

Asp Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His

35

40

45

ggc aat atg aat cgc agg ggt gtg gag gat gac ctg gcc ggg gag gag 238

Gly Asn Met Asn Arg Arg Gly Val Glu Asp Asp Leu Ala Gly Glu Glu

50

55

60

atc ggg gtg acc ttc cct ctg gat atg aag atg acg cag gag cag ttc 286

Ile Gly Val Thr Phe Pro Leu Asp Met Lys Met Thr Gln Glu Gln Phe

65

70

75

80

cag aag cag agg gct gcg gtg cag gac ttc ctg tac tcc tcc ctc ctc 334

Gln Lys Gln Arg Ala Ala Val Gln Asp Phe Leu Tyr Ser Ser Leu Leu

85

90

95

23/25

tct ctc ggg tca gtg cag gat aca gaa gac aag aat gaa aat cct cag 382  
 Ser Leu Gly Ser Val Gln Asp Thr Glu Asp Lys Asn Glu Asn Pro Gln  
                   100                  105                  110  
 agc caa tgagaatgat gaaaatccgc tcgtctctga tgccccctccc cgatctgtgt 438  
 Ser Gln

gtctttattia tctctgtgta acccagaaat aaatcttatt tatggc 484

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 462

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (12)... (257)

&lt;213&gt; Oncorhynchus mykiss

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rainbow trout  
 endogenous peptides (23 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 38

tcacaggtct c atg ata ctg atg ctg tgt act ctg gct ctg tgg gcc 47  
                   Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala  
                   1                  5                  10  
 aag tca gtc agt gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc tcc cag aaa cca 95  
 Lys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro  
                   15                  20                  25  
 cag gta aga cag ggt aaa ggg aag ccc cct cga gtt ggt cgg cga gac 143  
 Gln Val Arg Gln Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp  
                   30                  35                  40  
 att gag agc ttt gct gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa gac 191  
 Ile Glu Ser Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp  
                   45                  50                  55                  60  
 aaa cac aat acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg agt 239  
 Lys His Asn Thr Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser  
                   65                  70                  75  
 gag gag gag ttc cag gag tatgggtgccg tgctgcagaa gatcctgcag 287  
 Glu Glu Glu Phe Gln Glu

80

24/25

gacgtccctgg gagacactgc cactgcagaa tgaicacaac ttggcataga cacggaatac 347  
 aaagaacctc catccctgt tctccaactt tctttctca acttgtctta tacccaatgt 407  
 actgtgtgaa catcgtttga atgtataaag atgaataaaa taaccgcggc cgcta 462

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 453

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (12)... (308)

&lt;213&gt; Oncorhynchus mykiss

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rainbow trout  
 endogenous peptides (20 amino acids) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 39

tcacaggctc c atg ata ctg atg ctg tgt act ctg gct ctg tgg gcc 47  
 Met Ile Leu Met Leu Cys Thr Leu Ala Leu Trp Ala  
 1 5 10  
 aag tca gtc agt gct ggc tcc agc ttc ctc agc ccc tcc cag aaa cca 95  
 Lys Ser Val Ser Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Lys Pro  
 15 20 25  
 cag ggt aaa ggg aag ccc cct cga gtt ggt cgg cga gac att gag agc 143  
 Gln Gly Lys Gly Lys Pro Pro Arg Val Gly Arg Arg Asp Ile Glu Ser  
 30 35 40  
 ttt gct gag ctg ttt gag ggt ccc ctt cac cag gaa gac aaa cac aat 191  
 Phe Ala Glu Leu Phe Glu Gly Pro Leu His Gln Glu Asp Lys His Asn  
 45 50 55 60  
 acg atc aag gct cct ttt gag atg ggc atc acc atg agt gag gag gag 239  
 Thr Ile Lys Ala Pro Phe Glu Met Gly Ile Thr Met Ser Glu Glu Glu  
 65 70 75  
 ttc cag gag tat ggt gcc gtg ctg cag aag atc ctg cag gac gtc ctg 287  
 Phe Gln Glu Tyr Gly Ala Val Leu Gln Lys Ile Leu Gln Asp Val Leu  
 80 85 90  
 gga gac act gcc act gca gaa tgaicacaac ttggcataga cacggaatac 338  
 Gly Asp Thr Ala Thr Ala Glu  
 95  
 aaagaacctc catccctgt tctccaactt tctttctca acttgtctta tacccaatgt 398

actgtgtgaa catcgtttga attgtaaaag atgaataaaa taacactgct tcctt

453

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04907

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/18, A61P5/06, A61P19/08, A61K45/00, A61K48/00, G01N33/53 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/18, A61P5/06, A61P19/08, A61K45/00, A61K48/00, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/42840, A1 (ZYMOGENETICS, INC.), 01 October, 1998 (01.10.98), p.19, pp.54-58 & AU, 9865769, A & NO, 9904614, A & EP, 975760, A1 & BR, 9808059, A & CN, 1254375, A	1-32, 40-53
X	BLUET-PAJOT, M-T. et al., "Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion", Cellular and Molecular Neurobiology (1998), Vol.18, No.1 pp.101-104, p.109	1, 5, 33-36, 39, 54, 56
P, X	KOJIMA, M. et al., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach", NATURE (Dec.1999), Vol.402, No.9, pp.656-660	1-36, 39-54, 56
P, X	HOSODA, H. et al., "Purification and characterization of rat des-Gln <sup>14</sup> -Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor", J. Biol. Chem. (MAY, 2000), Vol.275, No.29, pp.21995-22000	1-36, 39-54, 56
P, X	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.),	1-32, 40-53
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 17 October, 2000 (17.10.00)	Date of mailing of the international search report 24 October, 2000 (24.10.00)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04907

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	09 December, 1999 (09.12.99), & AU, 9943286	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04907

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 37-39,55,57  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 37, 38, 55 and 57 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/18, A61P5/06, A61P19/08, A61K45/00, A61K48/00, G01N33/53

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12N1/21, C12P21/02, C07K16/18, A61K38/18, A61P5/06, A61P19/08, A61K45/00, A61K48/00, G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/42840, A1 (ZYMOGENETICS, INC.) 1. 10月. 1998 (01. 10. 98) p. 19, p54-58 &AU, 9865769, A &NO, 9904614, A &EP, 975760, A1 &BR, 9808059, A &CN, 1254375, A	1-32, 40-53
X	BLUET-PAJOT, M-T. et al. "Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion", Cellular and Molecular Neurobiology (1998) 第18巻, 第1号 p. 101-104, 109	1, 5, 33-36, 39, 54, 56

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 10. 00

国際調査報告の発送日

24.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	KOJIMA, M. et al. "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach", NATURE (Dec. 1999) 第402巻, 第9号 p. 656-660	1-36, 39-54, 56
P, X	HOSODA, H. et al. "Purification and characterization of rat des -Gln <sup>14</sup> -Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor", J. Biol. Chem. (MAY, 2000) 第275巻, 第29号 p. 21995-22000	1-36, 39-54, 56
P, X	WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.) 9. 12月. 1999 (09. 12. 99) &AU, 9943286	1-32, 40-53

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 37, 38, 55, 57 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲37、38、55及び57は、人の身体の治療による処置方法であるから、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。